

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Buco-Facial)

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES SUPERFICIES DE IMPLANTES
DENTALES”**

Estudio in vitro

Trabajo Fin de Máster

Máster Ciencias Odontológicas (2013-2014)

Autor: Marta Díez Medialdea

Director: Dr. Luis Blanco Jerez

Madrid, Septiembre 2014



Págs.

INDICE

1. Introducción	3
1.1 Tejido óseo y osteointegración	3
1.2 Éxito del implante	6
1.3 Diseño y estructura de los implantes	8
1.4 Superficies	12
1.5 Tratamiento de las superficies	13
1.6 Métodos de evaluación	19
2. Hipótesis y Objetivo	24
3. Material y Métodos	25
3.1 Implantes	25
3.2 Cultivos celulares	25
3.3 Microscopía Electrónica	26
4. Resultados	28
5. Discusión	38
6. Conclusiones	47
7. Bibliografía	48



1. INTRODUCCIÓN

El Titanio comercialmente puro es actualmente el material más utilizado en implantología. El Titanio es un metal reactivo que cuando se expone al medio ambiente, forma una capa fina espontánea de óxido de titanio de aproximadamente 2-10 micras de espesor.¹ Esta película protege el titanio haciéndolo altamente resistente a la corrosión.² Es la responsable de la biocompatibilidad y por tanto del proceso de osteointegración, creando un contacto directo con el tejido óseo.³

Las características biológicas y mecánicas de este material y sus aleaciones justifican su amplio uso en implantología, como su excelente resistencia a la corrosión, su biocompatibilidad y su capacidad de osteointegración. El Titanio comercialmente puro tiene diversos grados de pureza graduadas de 1 a 4. Esta pureza se caracteriza por el contenido de Oxígeno, Carbono y Hierro. La mayoría de los implantes dentales están hechos de grado 4, ya que es el más fuerte. Este material presenta buenas propiedades mecánicas, haciéndolo particularmente relevante y adecuado para aplicaciones biomédicas. Entre estas propiedades se encuentran su baja especificidad, alta resistencia y bajo módulo de elasticidad. Existen implantes dentales con una amplia variedad de diseños, cuyo objetivo principal común es el éxito a largo plazo de la función y la osteointegración.⁴

1.1. Tejido óseo y osteointegración.

En 1952, durante sus primeras observaciones sobre la biocompatibilidad del Titanio, Ingvar Branemark definió la osteointegración como la conexión directa y estructural entre el hueso vivo y ordenado y la superficie del implante sometido a carga. Estas observaciones fueron corroboradas por Larsson y colaboradores en 1997 que concluyeron que la interfase entre hueso-implante mostró pequeñas diferencias,



independientemente de las características físico- químicas de los implantes de titanio después de 1 año de observación.¹

El tejido óseo es un órgano vivo, compuesto por una matriz ósea extracelular, un componente celular (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, además de los contenidos vasculares) y un componente inorgánico mineral. La parte orgánica está formada por fosfato de calcio, un 90% de proteínas de colágeno (97% colágeno tipo I y 3% colágeno tipo V) y 10% de proteínas no colágenas (20% osteocalcina, 20% osteonectina, 12% sialoproteínas, 10% proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, factores de crecimiento, etc.) En cuanto al componente inorgánico, el más abundante es el carbonato de hidroxapatita (con un contenido de Carbonato de entre 4 % y 8 %). La hidroxapatita está compuesta de pequeñas plaquetas de 2-4 nm de espesor, 25 nm de anchura, y 50 nm de longitud. Esta matriz calcificada participa en el mantenimiento y la organización del hueso.³

El hueso es sometido a constantes remodelaciones por los osteoblastos y osteoclastos para adaptarse a los estímulos externos del ambiente circundante, lo que se conoce como la homeostasis ósea. Los osteoblastos son responsables de la síntesis, la deposición y la mineralización de la matriz extracelular. Se encuentran en las superficies óseas y forman una capa continua. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivascuales. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y osteoblastos vecinos. Poseen proteínas transmembrana con integrinas que actúan de enlace entre células y entre célula y matriz extracelular. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o matriz osteoide y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización, así como factores de crecimiento. Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Éstos, poseen forma estrellada y se sitúan en el interior de las lagunas u osteoplasmas. Los osteoclastos por su parte, son grandes células multinucleadas que están implicadas en la resorción ósea. Una característica



principal de este tipo de célula ósea es su borde rugoso, que forma proteínas y ácido clorhídrico. Son células grandes multinucleadas, que contienen fosfatasaácida-tartrato-resistente (TRAP), que permite la defosforilación de las proteínas. Proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos”. Las células actúan y responden a los diferentes estímulos de su entorno (mecánicos eléctricos, estructurales o químicos). El proceso dinámico de la reabsorción y formación ósea hace que se produzca una constante remodelación, lo que permite la regeneración ósea. Una serie de eventos complejos y fuertemente interrelacionados tiene lugar en la superficie del implante después de su inserción.³

En 1892, Wolff observó una asociación directa entre la carga mecánica y la formación y remodelación ósea. Su teoría implica que con el aumento de las tensiones se produce la neoformación de hueso, mientras que una disminución el estrés conduce a la pérdida de éste. Sin embargo, otros autores han cuestionado esta teoría, defendiendo que la resorción ósea también ocurre bajo tensiones extremas (Frost 1990). Por lo tanto, en el diseño del implante es de suma importancia que las espiras transmitan de forma óptima estas cargas o tensiones para que el remodelado óseo permita una correcta osteointegración. Así, deben ser diseñados para maximizar la producción óptima de tensiones favorables y reducir al mínimo la cantidad de tensiones adversas en la interfase implante-hueso, además deben permitir una mejor estabilidad y aumentar el área de la superficie de contacto del implante.⁵

El proceso de osteogénesis es controlado por numeroso factores entre los que se encuentran el ligando B soluble (sRANKL) y la osteoprotegerina (OPG). Los osteoblastos activan mediante el sRANKL los osteoclastos y la OPG (factor inhibidor de la osteoclastogénesis) contrarresta las actividades biológicas de RANKL bloqueando al receptor, deteniendo así el proceso de osteointegración. La producción de OPG se ve afectada por las características químicas de la superficie del implante.⁶



La fuerza de la carga oclusal funcional de un implante también se relaciona con la remodelación del hueso alveolar circundante. Una carga leve induce una respuesta de remodelación y reactiva la producción de hueso. Sin embargo, una carga excesiva provoca microfracturas que a su vez causan osteoclastogénesis. Cuando la capacidad de remodelación ósea es insuficiente para mantener el ritmo de las microlesiones, estos defectos se acumulan y se unen formando un defecto óseo. Como consecuencia de ello, el defecto formado será ocupado por tejido fibroso y microorganismos. Con el tiempo, se produce pérdida ósea severa, disminuyendo el soporte óseo alrededor del implante y aumentando el riesgo de fracaso.⁵

1.2.Éxito del implante

Hoy en día, el éxito del implante se evalúa a partir las perspectivas estéticas y mecánicas. Ambas dependen del grado y la integridad de la unión entre el implante y el hueso circundante. Además influyen diversos factores tales como la técnica quirúrgica, la calidad ósea, el diseño del implante, su geometría y topografía, la superficie del implante, la biocompatibilidad del material y las condiciones y momento de carga que afectan a su vez a la osteointegración del implante. Tras la colocación, los implantes de titanio interactúan con los fluidos biológicos y los tejidos circundantes formando la aposición ósea posterior. Esta aposición ósea directa es crítica para la carga rápida.^{4, 5}

La regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio se ha considerado como la situación similar a la observada después de un lesión o fractura. Esta curación se basa en las fases sucesivas de inflamación, regeneración y remodelación, con posible superposición en ciertas ocasiones. Sin embargo, existen grandes diferencias entre los dos tipos de curación (es decir, en ausencia o presencia de implante de titanio) tanto a nivel macro como a nivel celular y molecular. Ante la presencia de un implante, éste actuará como un sustrato osteoconductor disminuyendo el tamaño del



defecto. Un factor decisivo es el efecto de la superficie de titanio en los componentes biológicos que entran en contacto con la superficie en el momento de la colocación del implante. La superficie influye en la adsorción de proteínas, la adhesión de las plaquetas, la hemostasia, la activación del complemento, la inflamación y la respuesta de las células osteogénicas, en función de las propiedades de su superficie.⁷

La estabilidad primaria del implante es un requisito previo para la supervivencia del mismo, evitando de este modo la formación de una capa de tejido conectivo entre implante y hueso, para garantizar la curación del hueso.⁸ La estabilidad de un implante en el momento de su colocación (estabilidad primaria) está determinada por un conjunto de factores como son la calidad, la cantidad, la distribución y la densidad del hueso disponible en el sitio del implante, la geometría del implante y el método quirúrgico de colocación del implante.⁹ El tratamiento de la superficie también influye en la estabilidad primaria. La rugosidad causada aumenta la fricción entre la superficie del implante y el hueso, modificando la estabilidad primaria y aumentando la osteointegración. La superficie a su vez influye en la estabilidad inicial aun cuando no se produzca la osteointegración. La literatura muestra la gran eficacia de los implantes con superficies tratadas y la consiguiente formación de rugosidades permite un mayor contacto con células osteoblásticas.¹⁰ A su vez, la biocompatibilidad del implante y la capacidad de osteointegración pueden ser modificadas por ciertos factores tales como la composición de la superficie, la topografía, el grado de rugosidad, la energía libre superficial (SFE), la hidrofilia y la humectabilidad.¹¹

La integración del implante se caracteriza por una serie de reacciones biológicas que se inician con el recambio óseo en la interfase, seguido por la reparación. El criterio de valoración clínico común de este proceso se mide por la falta de signos y síntomas de la inflamación crónica agresiva, la falta de movilidad y una evaluación radiográfica de hueso adaptado a la interfase. La inflamación crónica puede estar influenciada por los diseños, los materiales o la rugosidad de la superficie del implante que conduce a largo plazo a la recesión del tejido e incluso da lugar a periimplantitis.



Tras la colocación del implante se producen una serie de procesos moleculares y celulares que proporcionan el nuevo crecimiento del hueso y la diferenciación a lo largo de la superficie del biomaterial. Después de la colocación, el hueso circundante se somete a una necrosis inicial, la resorción ósea y reemplazo, inicialmente con células de tejido similar que se sustituye a través de la remodelación por hueso maduro.¹² La osteointegración de los implantes dentales a su vez depende de las reacciones celulares del material, especialmente la adhesión celular sobre su superficie. La unión celular, la adhesión, y la difusión son las primeras fases de las interacciones entre las células del huésped y el implante. Estas reacciones afectan a la capacidad de las células para alojarse y proliferar en la superficie del implante y posteriormente generar tejidos óseos alrededor. Dichas interacciones dependen de la topografía de la superficie del implante, la composición química y la energía superficial.²

1.3. Diseño y estructura de los implantes

Las características de diseño de los implantes son uno de los elementos fundamentales que tienen efecto sobre la estabilidad primaria del implante y la capacidad para mantener la carga durante o después de la osteointegración. El diseño de los implantes se puede dividir en dos categorías principales: macrodiseño y microdiseño. El macrodiseño incluye la forma del cuerpo (cilíndrico, cónico, etc) y el diseño del tornillo (geometría, ángulo, profundidad y espesor de las espiras, etc.). La forma óptima permitirá la distribución equitativa de la tensión de la matriz del hueso que rodea el implante para promover el crecimiento óseo. El microdiseño abarca los materiales del implante, la morfología de la superficie y el tipo de revestimiento que afecta a las propiedades biomecánicas y que en gran medida determina el éxito o el fracaso del implante.⁵



Los implantes de tipo tornillo son el tipo más utilizado debido a su éxito y a su alto porcentaje de retención inicial. Varios parámetros en el diseño de las espiras afectan al éxito del implante, incluyendo la altura y la configuración. El paso de rosca es la distancia desde el centro de un hilo hasta el centro del hilo siguiente. Determina el área de superficie disponible para la interacción con el hueso y es por lo tanto un importante parámetro de diseño. El perfil de la rosca se caracteriza por la profundidad, por el número de hilos por unidad de longitud y el ángulo de la rosca. **(Fig. 1)**

Diferentes modificaciones en los patrones de rosca como microrrosas cerca del cuello del implante o macrorrosas en la mitad del cuerpo se han empleado para mejorar la biomecánica.¹³ **(Fig.2)**

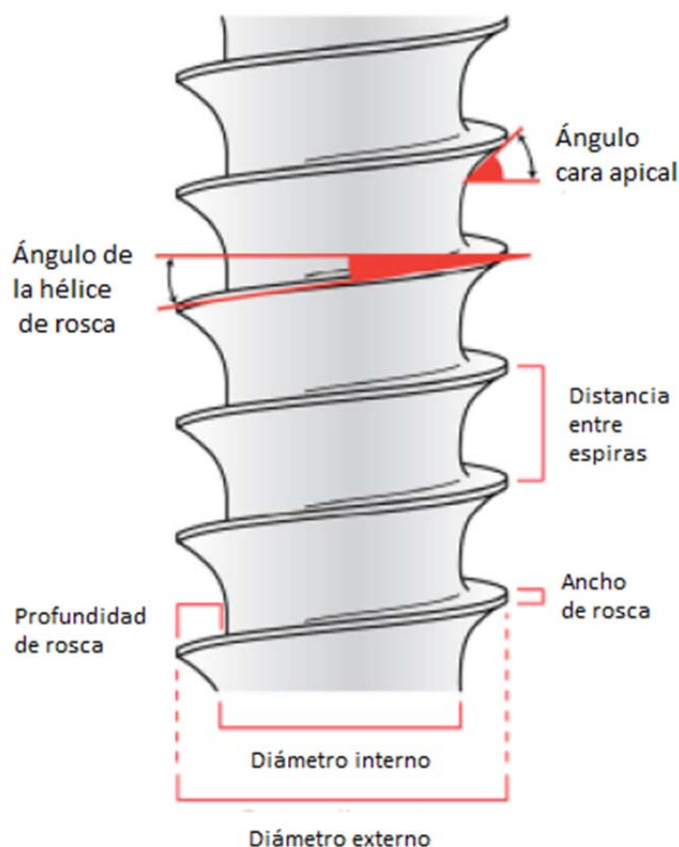


Fig. 1. Características básicas de macrodiseño de implantes. Abuhussein H. y cols. 2010.

Las interacciones químicas y biológicas entre el material y el tejido del huésped están estrechamente asociadas con las propiedades de la superficie del implante. Estas interacciones incluyen la unión de moléculas de agua, iones y biomoléculas, así como la mineralización en la superficie del implante. La superficie original puede ser así considerada como uno de los factores que van a determinar la regeneración de tejido alrededor del implante.⁵



La composición química de la superficie es generalmente Dióxido de Titanio (TiO_2). El óxido de la superficie es químicamente estable y resistente a la corrosión, lo que hace que las superficies de titanio sean bastante estables en condiciones fisiológicas normales. Además, las superficies están cubiertas por moléculas orgánicas. La capa de óxido puede variar en espesor desde nanómetros hasta varios micrómetros, dependiendo del método de preparación y las temperaturas implicadas.⁷

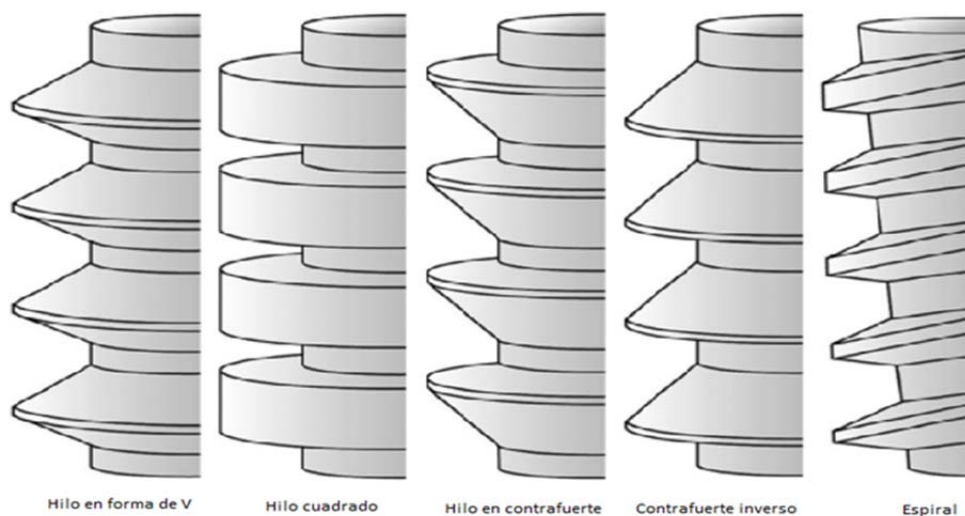


Fig 2. Tipos de patrones de rosca disponibles actualmente. Abuhussen y cols. 2010.

La microtopografía superficial también juega un papel destacado en las características biofuncionales de los implantes dentales de Titanio. Sus propiedades topográficas dirigen su interacción con el medio adyacente. De esta manera, las características físicas, químicas y mecánicas de la superficie del implante pueden modificar las interacciones de los implantes con los fluidos biológicos, tales como componentes de la sangre y elementos celulares de tejidos blandos y duros.⁶

Durante la colocación del implante, su superficie entra en contacto con el tejido óseo, el tejido gingival y la sangre. Un hallazgo en numerosos estudios es el hecho de que las superficies de los implantes con unas características específicas de rugosidad y

microestructura pueden promover el proceso de la osteointegración. (**Fig. 3**) Una topografía superficial microrrugosa aumenta la osteogénesis mediante la reducción de la formación y la actividad de osteoclastos.¹⁴

Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que la microtopografía de la superficie también modula la expresión de genes hacia un fenotipo osteoblástico. Cuando se cultivan líneas celulares osteoblásticas en superficies de Titanio con superficies microrrugosas, éstas adoptan un fenotipo típico de osteoblastos más maduros y con mayor actividad y producción de fosfatasa alcalina, osteocalcina (OC) y factor de crecimiento - b (TGF - b).^{6, 14, 15}

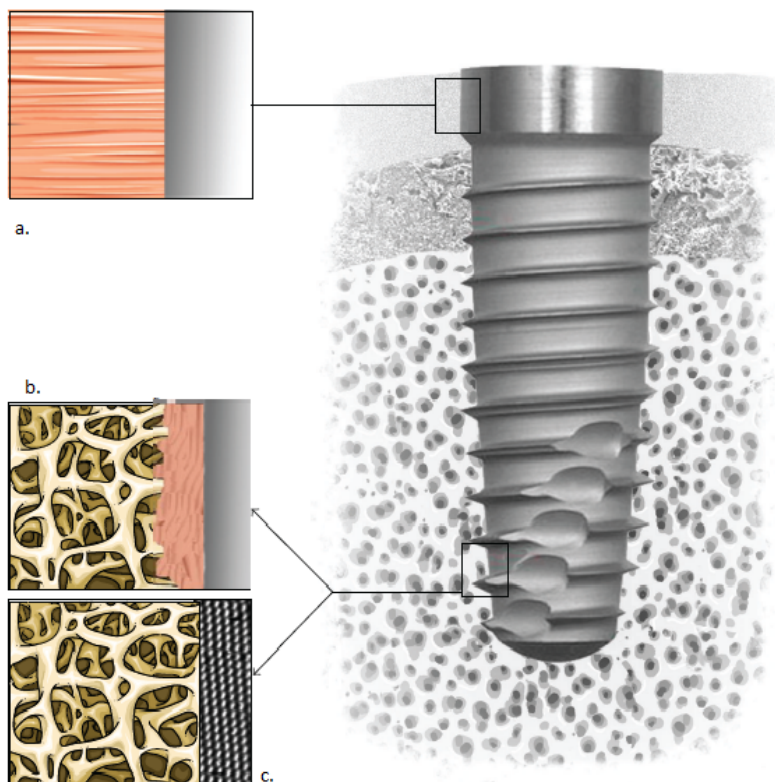


Fig 3. Integración del implante dental. Contacto íntimo con el tejido gingival (a), interfase entre implante y tejido óseo (b) y osteogénesis en contacto con la superficie (c). Lavenus S. y cols. 2010.

La expresión de diversos genes de osteoblastos (como VEGFC, IGF2 o CD36) así como su mineralización se ven afectados por las modificaciones de la superficie del implante que regulan la diferenciación de osteoblastos y sus factores de transcripción, así

como la síntesis de proteínas de la matriz ósea y factores autocrinos locales.^{11, 9, 16, 17}



La topografía superficial y la rugosidad también afectan positivamente al proceso de cicatrización ósea, fomentando una respuesta celular favorable produciendo proteínas de superficie e interacciones en la superficie celular.⁸

1.4. Superficies

Las actuales superficies de Titanio han ido mejorando durante los últimos años promoviendo la osteointegración del implante, respecto a las superficies lisas tradicionales. El uso de las tecnologías actuales que modifican la superficie del implante se ha convertido en una tendencia en la comercialización y en la producción de nuevos implantes, creando diversas morfologías, así como tratamientos químicos. Aparte de la textura de la superficie, la topografía de la superficie del implante influye cualitativa y cuantitativamente en su integración. Uno de los objetivos de la investigación actual en implantología es el diseño de dispositivos que induzcan a controlar, guiar y proporcionar una curación lo más rápida posible. Los implantes deben dar lugar a una matriz entre hueso e implante con una composición y estructura características y propiedades biomecánicas adecuadas.⁴

La modificación de la superficie de los implantes presenta todavía uno de los campos más novedosos y productivos en investigación de implantes dentales. El conocimiento de micro y macroestructuras se ha convertido en un campo importante en la búsqueda de un sistema que cumpla con los objetivos funcionales y biológicos.¹⁸

Las nanotexturas de superficie proporcionan un área de superficie mayor y con una menor rugosidad, lo que aumenta las propiedades mecánicas. Algunos estudios recientes han observado que las nano-estructuras tienen un impacto en la curación ósea temprana por su tamaño y la distribución óptima sobre las superficies de los implantes.^{18, 19} Estudios topográficos, tanto a nivel macro como micrométrico, han demostrado que la rugosidad media de la superficie es un factor importante para lograr una osteointegración estable⁹ promoviendo así la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular, con la formación de nódulos de hueso y por lo tanto, conseguir



un aumento del área de contacto hueso-implante, reduciendo así el tiempo necesario para su finalización y mejorando la supervivencia del implante.^{1,9,11,16,19} Las ventajas de las superficies modificadas han sido observadas también en situaciones a largo plazo, sobre todo en casos de áreas comprometidas desde el punto de vista óseo.¹⁸

Varios estudios han demostrado que los aumentos en la superficie de micro y macro rugosidades, conducen a un aumento en la diferenciación de osteoblastos y la producción de factores locales en vitro²⁰, el aumento del área de contacto hueso-implante y la mejora de las tasas clínicas de cicatrización de la herida.²¹

La carga de la superficie de un implante también es otro factor clave en la adhesión de las células óseas durante la etapa temprana de mineralización en la interfaz hueso-implante. La energía de la superficie de un biomaterial se determina por la densidad de la superficie de carga de material y la polaridad neta de la carga. Por lo tanto, esta modificación parece mejorar la osteointegración. El principal objetivo de las nuevas tecnologías es el desarrollo de técnicas eficaces y prácticas que aporten una larga duración del campo eléctrico en la superficie del implante.²

1.5. Tratamiento de las superficies

Entre las características de la superficie que han sido probadas para modificar la respuesta biológica en torno a los implantes de Titanio, la energía libre superficial y la hidrofilia parecen ser críticas para la adhesión inicial de los componentes celulares y las proteínas a la superficie, entre otras macromoléculas. La hidrofilia se puede optimizar mediante la eliminación de la contaminación por hidrocarburos y carbonatos, mejorando la adsorción de proteínas y componentes de la sangre y la adhesión celular.^{6, 11} La liberación de iones de metal en la superficie de implantes con diferente tratamientos mejora la proliferación celular y acelera la actividad de la fosfatasa alcalina.²²



Tanto la morfología como la rugosidad superficial influyen en la proliferación y la diferenciación celular, en la síntesis de la matriz extracelular e incluso en la morfología celular. Además, la forma inicial de la célula regula su propio crecimiento, así como la expresión de genes, la secreción de proteínas, la diferenciación, y la apoptosis, por lo que es esencia conseguir una forma inicial adecuada en las superficies. Además, las modificaciones creadas no sólo facilitan la retención de las células osteogénicas, también les permite migrar a la superficie del implante por un medio osteoconductor.^{23, 24} Por lo tanto, las diferentes superficies deben mantener la viabilidad celular y permitir conservar los filamentos celulares de actina sin afectar la toxicidad de las células.²²

Existe una gran variedad de tratamientos de las superficies, que van desde las superficies suavizadas a las superficies rugosas resultantes de diversas modificaciones físicas y químicas.⁹ Los métodos para alterar la textura de superficie se pueden clasificar como técnicas que añaden partículas en el biomaterial a modo de revestimiento, creando una superficie con protuberancias (mecanismos aditivos) y las técnicas que eliminan el material de la superficie, creando hoyos o poros (mecanismos de sustracción). Ejemplos de procesos aditivos son: recubrimientos con Hidroxiapatita y fosfato cálcico (CaP), deposición por medio de pulverización de spray de plasma de Titanio y deposición de iones. Ejemplos de métodos sustractivos son el pulido eléctrico o mecánico, el chorreado con arena, el grabado ácido y la oxidación.^{6, 9, 16}

Una técnica de sustracción comúnmente utilizada es el chorreado con arena junto con un procedimiento de grabado ácido (SLA). Se producen así microcavidades de 20-40 μ m de diámetro y microalveolos de 0,5 - 3 μ m de diámetro.¹¹ A continuación se exponen los diferentes métodos de tratamiento de superficies:

1. Mecanizado. Los implantes se someten a limpieza, descontaminación, pasivación y esterilización, pero la superficie no se modifica.



2. Pulverización con plasma. Este es uno de los métodos más comunes en el que polvos de diferentes sustancias (por ejemplo, Titanio o fosfatos de Calcio) se calientan a altas temperaturas y luego se proyectan sobre las superficies para formar recubrimientos de entre 30 y 50 micras. Esta técnica confiere una superficie rugosa con una rugosidad media de 7 μm y aumenta el área de superficie del implante hasta 6 veces. El espesor del recubrimiento depende del tamaño de la partícula, la velocidad y el momento del impacto, la temperatura, y la distancia a la superficie del implante. Las partículas de Titanio proyectadas sobre la superficie se condensan y se fusionan, creándose un recubrimiento de plasma de titanio pulverizado (TPS), aumentando sustancialmente el área de la superficie de los implantes. Al variar la composición de la solución, el tiempo de inmersión y la temperatura, estas técnicas ofrecen múltiples posibilidades para variar el espesor, la morfología y la composición de los recubrimientos.⁷

3. Arenado o chorreado. La superficie del implante se modifica mediante la proyección de partículas duras (de alúmina o de TiO_2) a altas velocidades. La rugosidad depende del tamaño de la partícula, el tiempo, la presión y la distancia a la superficie del implante. Las principales ventajas de esta técnica es que se mejora la adhesión, la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos.²³

4. Grabado ácido. Esta técnica consiste en aumentar el espesor de la capa de óxido y la rugosidad por inmersión del implante metálico en una solución ácida (HCl o HF), que erosiona la superficie produciendo micro poros con tamaños que van desde 0,5 hasta 2 μm . Los factores que determinan el resultado del ataque químico son la concentración de la solución ácida, el tiempo, y la temperatura. La principal ventaja de los tratamientos con ácido es que proporcionan rugosidad homogénea, un mayor área de superficie activa y mejoran la adhesión de células, y por lo tanto la osteointegración.²³

5. Arenado con partículas de cerámica y grabado ácido (SLA): La razón principal para la combinación de estos dos métodos es que hipotéticamente, el chorreado crea una



rugosidad óptima y aporta fijación mecánica, mientras que el grabado ácido suaviza las elevaciones creadas y mejora la adhesión de proteínas. Las características de la superficie obtenidos dependen del tipo de partículas, su dureza, tamaño, y velocidad de impacto. El grabado ácido elimina varias capas atómicas de la superficie y reduce la posibilidad de contaminación de las partículas sobrantes del proceso de limpieza, ya que también actúa en la limpieza la superficie. Los agentes de grabado ácido más utilizados son ácido fluorhídrico, nítrico, sulfúrico y sus combinaciones. La técnica más usada es el doble grabado con ácido, que se lleva a cabo en dos fases: en una primera inmersión de los implantes en soluciones de Ácido Clorhídrico + Ácido Sulfúrico, Ácido Nítrico + Ácido Fluorhídrico o Ácido Nítrico. Después el implante es de nuevo inmerso en una solución acuosa de Ácido nítrico que estabiliza la capa de óxido de titanio superficial.²³ El arenado se realiza mediante la propulsión de partículas de diferentes tamaños de sílice, alúmina y óxido de Titanio. La técnica de SLA combina las ventajas de las técnicas de chorreado y grabado ácido y presentan la mejor opción de capacidad de humectabilidad y un buen ángulo de contacto.^{25, 26}

6. Anodización. Es un proceso electroquímico en el que el implante se sumerge en un electrolito, mientras que se aplica una corriente eléctrica, produciendo microporos de diámetro variable y un aumento de la capa de óxido. Las principales ventajas de la técnica de anodización incluyen una biocompatibilidad mejorada y una mayor unión y proliferación celular.¹³

7. Recubrimiento. Los implantes dentales se pueden recubrir con una gran variedad de materiales y / o moléculas en función de la aplicación y los requisitos específicos. Un ejemplo incluye el recubrimiento de la superficie con fosfatos de Calcio para producir superficies bioactivas que mejoran el contacto hueso-implante. Los iones fluoruro pueden conducir a un aumento de la calcificación del hueso. Además, dado que los osteoblastos reconocen moléculas específicas es posible recubrir superficies de implantes con moléculas inmovilizadas para mejorar la unión celular, la deposición de proteínas y la mineralización. Estas moléculas inmovilizadas incluyen secuencias de



aminoácidos, colágeno, grupos funcionales, sustancias farmacológicas (bisfosfonatos) y agentes antimicrobianos (tetraciclinas). Los recubrimientos por tanto aumentan la diferenciación celular osteoblástica y la expresión de genes osteoblásticos específicos.

13, 27

8. Modificación química. Hay dos grandes tipos de alteraciones químicas: la adición de compuestos inorgánicos (por ejemplo, hidroxiapatita o fosfatos de Calcio) y la adición de compuestos orgánicos (como factores de crecimiento). La adición de fases inorgánicas, tales como fosfatos de Calcio, imparte propiedades osteoconductoras. El fosfato de calcio aumenta la velocidad de formación de hueso.²³

Este proceso se basa en la formación de fluorapatita resultado de la interacción de fluoruro e HA presente en el tejido óseo, seguido de la promoción y proliferación de osteoblastos y estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina.¹⁶ Otra alternativa son los revestimientos de silano y tioles con diferentes grupos terminales, que ofrecen una amplia variedad de propiedades químicas a la superficie. Se pueden utilizar para modular la hidrofilia de la superficie y para introducir grupos funcionales químicos específicos (por ejemplo, metilo, grupos hidroxilo o carboxilo) y así modular la respuesta biológica.⁷ Otros procedimientos químicos incluyen tratamientos con hidróxido de sodio y tratamiento con calor, oxidación anódica, tratamiento con fluoruro e implantación de iones. Estas técnicas añaden propiedades de unión bioquímicas y modifican la composición química de la superficie permitiendo interacciones con los osteoblastos. Con la implantación de iones, tales como el Magnesio, la unión y la proliferación celular aumenta y la diferenciación hacia osteoblastos se mejora.^{25, 28}

- Recubrimientos Inorgánicos de fosfato de Calcio: son aplicados con frecuencia como recubrimientos sobre la superficie del implante con el fin de combinar la fuerza mecánica de los metales con las excelentes propiedades biológicas de la cerámica de fosfato de Calcio. Estos recubrimientos inducen un aumento de



contacto entre hueso e implante, promoviendo así la osteoconducción y mejoran la fijación del implante. Desde el punto de vista comercial, el método más exitoso ha sido la técnica de pulverización de plasma, debido a su alta velocidad de deposición y la capacidad para revestir grandes áreas. Deben tener al menos 50 micras de espesor para cubrir completamente el implante y requiere un tratamiento previo del sustratos tales como el chorro de arena para aumentar el enclavamiento mecánico del revestimiento.³ Por el contrario, la concentración de Calcio parece no tener efecto significativo en la mejora de la osteointegración de las superficies modificadas.^{28, 29}

- Recubrimiento orgánico con biomoléculas: los implantes bioquímicamente modificados con biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie , tales como factores de crecimiento, inducirán cierta respuestas de las células y determinará posteriormente la adhesión celular, ya que las proteínas actúan como medio para la fijación de células. Esto se logra por medio de las integrinas, que son receptores transmembrana específicos que se unen a las proteínas de la superficie de los biomateriales y a los componentes del citoesqueleto.⁶ Los péptidos que contienen los dominios de unión a células que se encuentran en las proteínas de la matriz extracelular se inmovilizan en el material para promover la adhesión celular a través de interacciones ligando-receptor. Las integrinas se unen a aminoácidos específicos, tales como la fibronectina, osteopontina y sialoproteína ósea. Las secuencias de péptidos, tales como RGD, han sido utilizados como modificaciones demostrando la promoción de la adhesión celular.¹⁶

Otro enfoque interesante en estudio es incorporar y / o adjuntar moléculas y sustancias farmacológicas para la liberación local del implante o material de injerto. Un ejemplo es el uso de los bisfosfonatos, que regulan la actividad de los osteoclastos y en consecuencia se produce una regeneración ósea más rápida alrededor de los implantes. Otro ejemplo es la aplicación local de simvastatina en combinación con hueso, aumentando la promoción de la formación de hueso y la inhibición de la actividad osteoclástica.⁷



Los recubrimientos orgánicos disponibles en la actualidad incluyen la inmovilización de proteínas (tales como colágeno) o la deposición de agentes de señalización celular (factores de crecimiento óseo: BMPs, TGF - β , FGF, PDGF, etc.) para activar la formación de hueso nuevo aumentando la actividad osteoblástica. Incluso la inmovilización de ADN para reforzar la estructura ósea y enzimas para una mejor mineralización ósea. La estructura del ADN permite su interacción con otras moléculas que provocan respuestas celulares específicas. Además, el alto contenido de fosfato en el ADN puede afectar beneficiosamente a la deposición de los fosfatos de calcio debido a la alta afinidad existente entre ellos. Los complejos de ADN – lípido, pueden ejercer efecto antibacteriano.³

La disolución de los recubrimientos aumenta la fuerza iónica que conduce a la precipitación de nanocristales de apatita biológicos sobre la superficie. Esta capa incorpora proteínas y promueve la adhesión de células osteoprogenitoras que producirían la matriz extracelular del tejido óseo. Además, también se ha demostrado que los osteoclastos son capaces de degradar estos recubrimientos a través de vías. La presencia de CaP en metales promueve una osteointegración temprana en comparación con las superficies no revestidos.³⁰

Así, en función del tipo de tratamiento se aportan unas características específicas a la superficie, modificando su composición química inicial, en pro de mejorar la osteointegración.²⁵

1.6. Métodos de evaluación

El avance de la ciencia y la tecnología permite obtener cada vez más pruebas y datos sobre el valor de rugosidad óptima para la fijación del implante y osteointegración a través de estudios con microscopía, histomorfometría incluso pruebas biomecánicas.⁹

Los métodos de evaluación de la osteointegración se pueden clasificar como invasivo o no invasivo, mediante la evaluación del implante *in situ* (en *in vivo*) o *ex situ* (*ex vivo*) del paciente o de animales de experimentación, respectivamente. La evaluación *in vivo*



de implantes se limita a diferentes técnicas de medición con rayos X y métodos de resonancia magnética. El método más común para la evaluación de los implantes y del tejido circundante incluyen pruebas biomecánicas, microscopio óptico, microscopía focal de barrido láser y microscopía electrónica de barrido (SEM). La evaluación histológica de hueso adyacente a los implantes dentales se realiza utilizando variaciones de la técnica descrita por Donath y Breuner y la evaluación por microscopía óptica. Esta es la metodología estándar utilizada para la determinación del porcentaje de contacto hueso-implante, que se define como el porcentaje de la longitud del implante con la que hay contacto directo de hueso, sin intervenir tejido fibroso. Los inconvenientes del procedimiento clásico, incluyen la necesidad de tinción, la baja resolución, los procedimientos de laboratorio que enlentecen los resultados y el riesgo de sesgo en la evaluación microscópica. Algunos estudios han utilizado CLSM para visualizar imágenes de alto contraste de tejidos óseos sin la necesidad de procesamiento de la muestra y la tinción. También se ha utilizado la adquisición de la luz reflejada procedente del implante y del tejido. La diferencia de intensidades entre ambas superficies se utiliza para medir el BIC. Recientemente, el análisis con SEM se ha utilizado para evaluar la composición de hueso neoformado con diferentes sistemas de implantes. La microscopía electrónica de barrido se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Un barrido de haz de electrones incide sobre la muestra recubierta generalmente con una fina capa de oro o carbón. Los detectores recogen la energía y lo transforman en diferentes detectores (de electrones secundarios y de electrones retrodispersados) que permiten obtener la definición y el contraste de las imágenes y el detector de energía dispersiva (EDS) que detecta los rayos x generados y permite analizar cuantitativamente la composición atómica de las superficies analizadas así como la forma química en la que se encuentran los elementos detectados.^{31, 32} Existen también microscopios electrónicos 3D (3D-SEM) que permiten la posibilidad de analizar tanto la topografía superficial como la capacidad de retención con el tejido óseo circundante de la superficie junto con microscopios de fuerza atómica (AFM).³³



Los estudios más recientes utilizan cultivos celulares como método de evaluación. Las células madre son células indiferenciadas que poseen la capacidad de dividirse y formar células idénticas también indiferenciadas. Bajo condiciones específicas pueden diferenciarse en varios tipos celulares. Las células madre se dividen en dos grandes grupos: células madre embrionarias y células madre adultas. Éstas se localizan en tejidos como la médula ósea, tejido graso, piel y pulpa dental.^{9, 34} Las células madre mesenquimales constituyen una de las herramientas para investigar la interacción entre las células óseas y la superficie del implante. Éstas son células multipotentes capaces de autorenovarse proliferar y diferenciarse en un número limitado de líneas celulares precursoras de varios tejidos³⁵ incluyendo células osteoprogenitoras, líneas condrogénicas y adipogénicas.¹⁸ Se encuentran en el tejido adiposo, el músculo esquelético, cordón umbilical y tejidos dentales entre otras localizaciones. Fueron caracterizadas por primera vez hace 49 años por Friedenstein y su grupo de investigación. Estas células presentan una serie de propiedades específicas como una morfología celular similar a la de los fibroblastos, capacidad de adhesión en superficies y cultivos y potencial osteogénico.³⁴ Existen varias líneas diferentes de células madre mesenquimales en los dientes. Según su localización se pueden clasificar en células madre de pulpa dental (DPSCs), células madre de dientes temporales exfoliados (SHEDs), células madre de ligamento periodontal (PDLSCs), células madre de folículo dental (DFSCs) y células madre procedentes de la papila dental (SCAPs).^{34,36}

El procedimiento de obtención de DPSCs es fácil y el sacrificio del tejido es muy bajo en la recogida de las células.^{37, 38} Además se pueden obtener varios tipos celulares y las muestras pueden ser preservadas y almacenadas durante largos períodos de tiempo, manteniendo sus características tras la criopreservación.^{38, 39}

Estas células pueden formar tejido óseo cuando son trasplantadas *in vivo* y se diferencian fácilmente *in vitro*. Están involucradas en la remodelación y reparación ósea y desempeñan un papel fundamental en la osteointegración.^{11, 18} Además de su capacidad regenerativa en implantología e ingeniería tisular^{40, 41} las células madre mesenquimales suponen un método ideal para observar el comportamiento de los biomateriales en relación con el tejido vivo.^{1, 16}



El proceso de osteointegración se inicia por las células precursoras de osteoblastos, que migran hacia la superficie del implante, se adhieren a ella y producen factores osteogénicos que inducen la diferenciación celular hacia osteoblastos. Este proceso incluye una serie de factores de transcripción entre los que se encuentra Runx2, que induce la diferenciación de las células madre mesenquimales a osteoblastos.⁴² Después de la coagulación de la sangre alrededor de los implantes dentales tras su colocación, varias células interactúan con las superficies para la curación de los tejidos. Las células madre mesenquimales (MSC) tienen un papel determinante en la cicatrización del tejido periimplantario. Estas células derivadas de tejido somático, pueden diferenciarse en linajes mesenquimales tales como hueso, cartílago, grasa y piel. Además, están presentes en muchos tejidos conjuntivos. Son células no especializadas capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular, a veces después de largos períodos de inactividad y en determinadas condiciones fisiológicas o experimentales pueden ser inducidas a convertirse en células órgano-específicas.³⁰

Los resultados observados en estudios recientes muestran una mejor capacidad de adhesión y una tasa de proliferación más alta cuando las células madre mesenquimales se cultivan en las superficies de implantes tratadas.^{43, 44} Esta modificación induce la expresión de marcadores de diferenciación osteoblásticos (RUNX2 y osteopontina) en ausencia de cualquier factor de diferenciación externo, lo que conduce a una mejora en la osteoinducción. La colocación del implante induce el reclutamiento de MSC en la zona de la herida, que tras diferenciarse a células osteoprogenitoras, intervienen en la formación de hueso.⁴⁵ Las células madre mesenquimales son las primeras células que colonizan la superficie del biomaterial después de la implantación y se han utilizado en numerosos estudios como una fuente de células osteogénicas para reparar el tejido óseo. Varias investigaciones han mostrado que la modificación de la superficie puede mejorar el proceso de osteointegración, la adhesión celular y la expresión de genes relacionados con la osteogénesis y otros comportamientos celulares como la proliferación, la actividad de fosfatasa alcalina y la mineralización.⁴⁶



Una reciente alternativa de estudio con células madre sobre superficies de implantes es su cultivo en estructuras 3D. Las células se adhieren a la superficie y crean mecanismos de unión celular. Además su crecimiento es similar al de las células cultivadas en 2D y crean nichos que promueven la proliferación de más células. Se ha observado que este tipo de cultivo muestra una mayor tendencia a la mineralización y diferenciación osteoblástica que los cultivos tradicionales en 2D. Por lo tanto, los cultivos en 3D pueden mejorar el proceso de osteointegración en las superficies de implantes, reduciendo así el tiempo de tratamiento.⁴⁷

Las líneas celulares de osteoblastos derivados de un osteosarcoma humano, presentan a su vez un relevante modelo *in vitro* de la osteointegración, debido a sus grandes analogías con los osteoblastos inmaduros. Esta línea celular inmortalizada es relativamente más fácil de mantener durante un largo período de tiempo sin una pérdida de expresión fenotípica, pudiendo ser una alternativa al sistema de cultivo de células humanas.¹⁴ Las células MG63 derivadas de osteosarcoma humano cultivadas en superficies rugosas de Titanio aumentan su adhesión y la diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico, así como la producción de niveles más altos de factores de crecimiento en comparación con las lisas.¹⁶ De la misma forma, las células SAOS-2 similares a osteoblastos mejoran la osteointegración de superficies tratadas aumentando su diferenciación, proliferación y adhesión.⁴⁸

La investigación continúa actualmente con el objetivo de mejorar aún más el rendimiento de los implantes dentales, acelerar y mantener su integración tanto en tejidos duros y blandos así como ampliar sus indicaciones y mejorar su osteointegración.^{9, 18} A pesar de la amplia utilización clínica de estas superficies, la mejora de la velocidad y el grado de formación de hueso nuevo se mantiene todavía en estudio, debido quizá a la falta de métodos estandarizados y los diferentes parámetros utilizados en la literatura que no permiten una fácil comparación de los resultados obtenidos.¹⁸ Es por eso que aunque varios tratamientos de superficie han



proporcionado resultados prometedores, no existe un acuerdo en la literatura en cuanto a la superficie ideal.¹

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO:

Hipótesis nula (H_0): no existen diferencias en la composición, diseño y capacidad de adhesión celular de células madre mesenquimales de pulpa dental en los diferentes implantes estudiados tratados con grabado ácido (SLA).

Hipótesis alternativa (H_1): Las superficies de implantes con tratamiento de grabado ácido (SLA) presentan una composición y diseño que permiten la capacidad de adhesión de células madre de la pulpa dental (DPSC).

El objetivo de esta investigación es comparar y analizar la composición y características de las superficies de tres implantes de titanio tratados con grabado ácido (SLA). Se analizaron la macroestructura y microestructura de las superficies y su composición química. La adhesión de células madre mesenquimales de pulpa dental (DPSC) se evaluó en las diferentes superficies para comprobar si el comportamiento celular está influenciado por la microestructura superficial y la composición química de los implantes.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. IMPLANTES

En el presente estudio se utilizaron 6 implantes, 2 de cada una de las tres casas comerciales diferentes. Se utilizó un implante de cada casa para el estudio de la morfología y composición y otro de cada lote para el estudio de crecimiento y adhesión de células madre mesenquimales de pulpa dental sobre su superficie. Los implantes estaban en embalaje original estéril y fueron abiertos justo antes del análisis. Los productos biológicos de cultivo celular fueron proporcionados por el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la UCM.

3.2. CULTIVOS CELULARES

Para el cultivo celular se utilizaron células madre mesenquimales de pulpa dental procedentes de molares de individuos sanos extraídas por motivos ajenos a la investigación.

Para evaluar la capacidad de adhesión a las superficies de los implantes de células capaces de diferenciarse a hueso, se utilizó una línea de células madre de pulpa dental adulta (DPSC) caracterizada previamente en el laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Odontología de la UCM.

En un frasco de cultivo se sumergieron los implantes extraídos de su envase estéril y se mantuvieron durante media hora en contacto con medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-glutamina y penicilina/estreptomicina a 37°C. Se añadió al medio un concentrado de las células madre para obtener una concentración final de 2000 células/ml. Se mantuvo el frasco de cultivo en condiciones estándar de cultivo en estufa a 37°C con 5% de CO₂.

Tras 48 horas de incubación, se procedió a extraer cuidadosamente los implantes y se lavaron dos veces en PBS. Se realizó el fijado celular con una mezcla de glutaraldehído y formaldehído. Después de la fijación, se lavaron con solución salina tamponada con



fosfato (PBS). Las muestras se deshidrataron posteriormente por medio de una serie gradual ascendente de concentraciones de etanol.

Para su análisis microscópico, las muestras se llevaron a punto crítico mediante lavados sucesivos con CO₂ líquido en el laboratorio del Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la UCM y posteriormete se realizó el *sputtering* u orificación de la superficie en el que las células fueron recubiertas de una capa de oro de 10-15 nm mediante pulverización catódica de iones.

3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Análisis de la topografía y composición de las superficies.

En el primer análisis, las superficies de titanio se midieron cualitativa y cuantitativamente por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar su estructura superficial y su composición. El análisis se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

Tras ser colocados individualmente en la plataforma e introducidos en el microscopio, los implantes fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con energía dispersiva de rayos X (EDX). Se observó la morfología del implante utilizando un microscopio JEOL JSM 6400 que opera a 25 kV de tensión. Todos los implantes fueron evaluados a 12, 500, 1.000, 2.000, 10.000 y 15.000 aumentos y a dos distancias focales de trabajo (39mm y 15mm) para proporcionar una visión de la macroestructura. Se analizó el paso de espira, la forma de la espira, la profundidad del surco y el tamaño de los poros. Posteriormente se analizó la composición de la superficie con neospectrofotómetro junto con análisis de sonda EDX a 15.000 aumentos con una resolución de 133eV con el mismo procedimiento descrito anteriormente.

(Fig. 4)

Se obtuvieron imágenes en diferentes puntos de la superficie de las muestras, distribuidos al azar, que pertenecen tanto a zonas de valle entre las espiras de los



implantes como a zonas de cresta de las espiras. Posteriormente las imágenes fueron procesadas y analizadas.

Análisis de la capacidad de adhesión de células madre mesenquimales de pulpa dental.

El segundo análisis evaluó la capacidad de adhesión de células madre mesenquimales de la pulpa dental. Tras el cultivo celular descrito anteriormente, las muestras recubiertas con una capa de oro fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con el mismo microscopio descrito anteriormente a 12, 100, 500, 1.000, 1.500 y 2.000 aumentos y con las mismas distancias focales que en el análisis de la composición y estructura. Se obtuvieron imágenes de diferentes zonas distribuidas al azar de las tres muestras que posteriormente se procesaron y analizaron.



Fig. 4. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6400. Centro Nacional de Microscopía Electrónica UCM.

4. RESULTADOS

Todos los implantes estudiados presentan una estructura en forma cónica de tornillo. Las espiras, surcos y valles se disponen de forma paralela. A baja resolución, los análisis electrónicos de barrido sugieren una leve rugosidad en todas las superficies tratadas con apariencia homogénea. **(Fig. 5)** La microscopía de alta resolución reveló la presencia evidente de características de rugosidad con la creación de microporos de diversos tamaños y diámetros en las tres superficies tratadas mediante grabado ácido (técnica SLA). **(Fig. 6)**

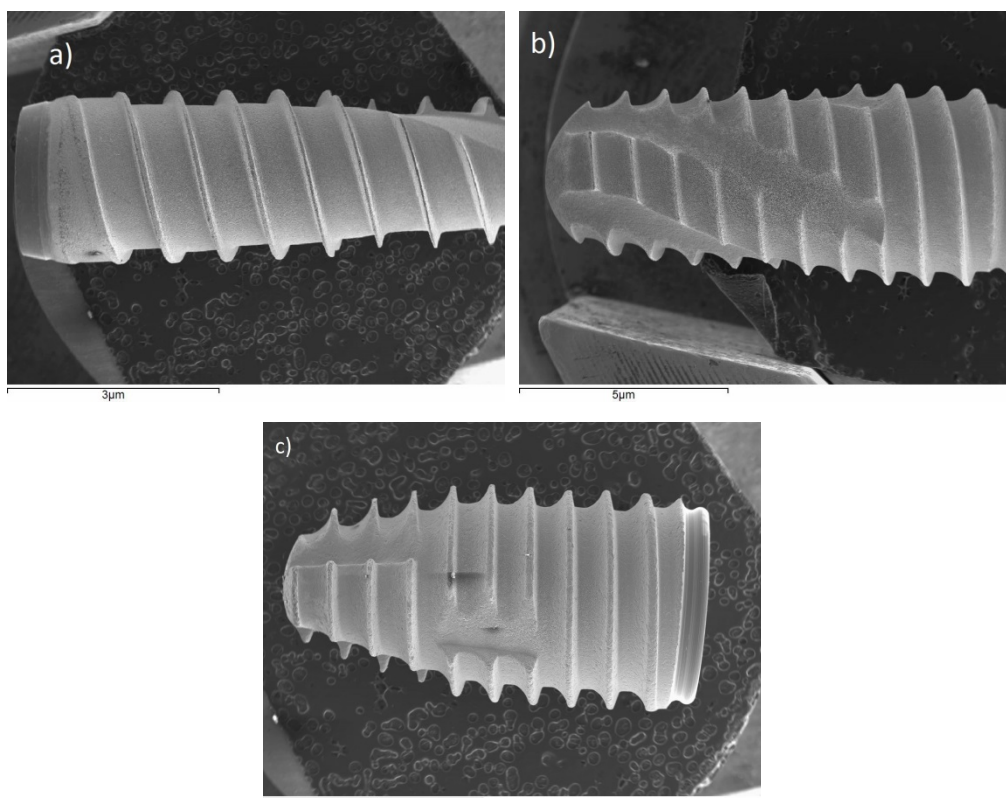
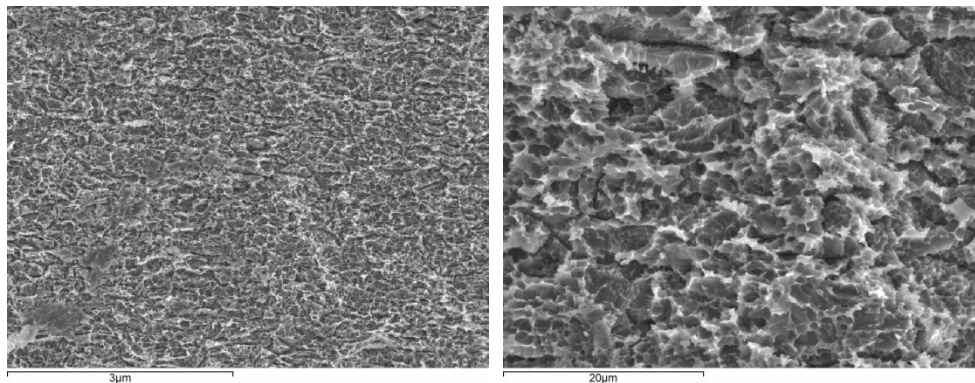


Fig. 5. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las superficies 1 (a), 2(b) y 3(c) tratadas con SLA. Aumento 12X.

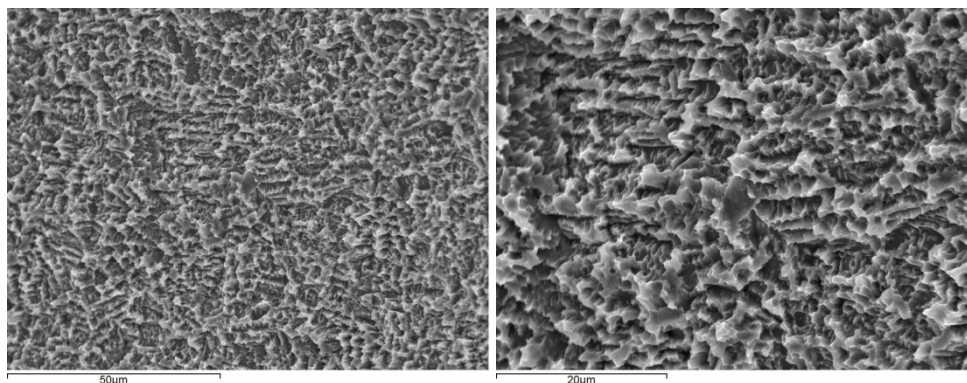
El análisis XPS con electrones retrodispersados mostró composiciones similares en todas las superficies identificando Titanio (Ti), Oxígeno (O₂) y Carbono (C) como los principales componentes presentes en diferentes formas químicas.



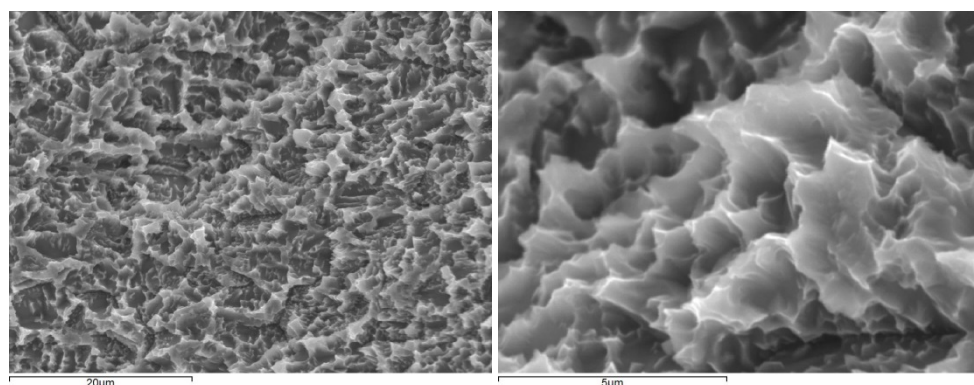
La composición química de la superficie 1 consta de Titanio (TiO_2), Carbono (CO_2) y Oxígeno (O). **(Fig.7)** Los microporos creados presentaron 1.12, 1.48 y 2.30 μm de diámetro en el análisis por sonda EDX. **(Fig. 8)** La distancia entre las espiras fue de 728nm. **(Fig. 9)**



Superficie 1. Imágenes SEM de izquierda a derecha 500X y 2.000X.



Superficie 2. Imágenes SEM de izquierda a derecha 1.000Xy 2.000X.



Superficie 3. Imágenes SEM de izquierda a derecha 2.000X y 10.000X.

Fig. 6. Imágenes SEM de las tres superficies de implantes tratadas con SLA a diferentes aumentos.

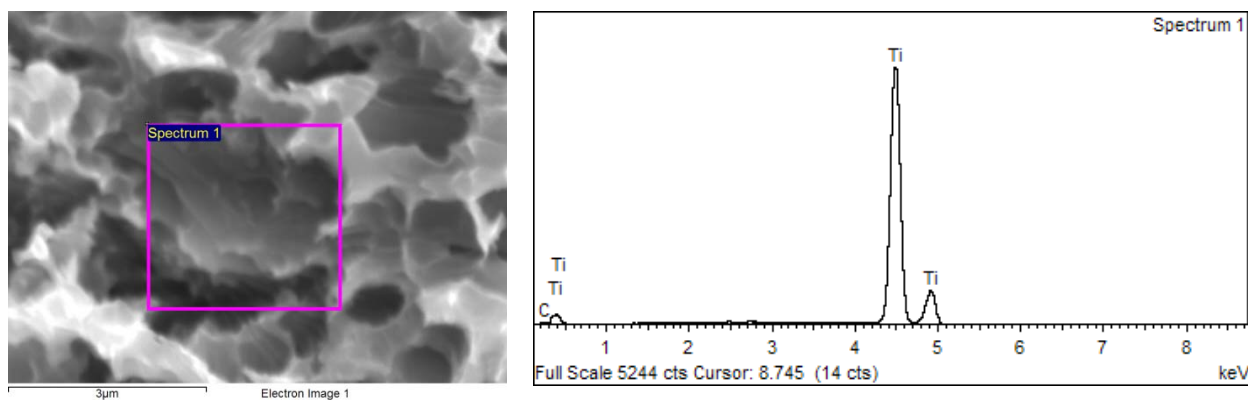


Fig. 7 Composición química superficie 1.

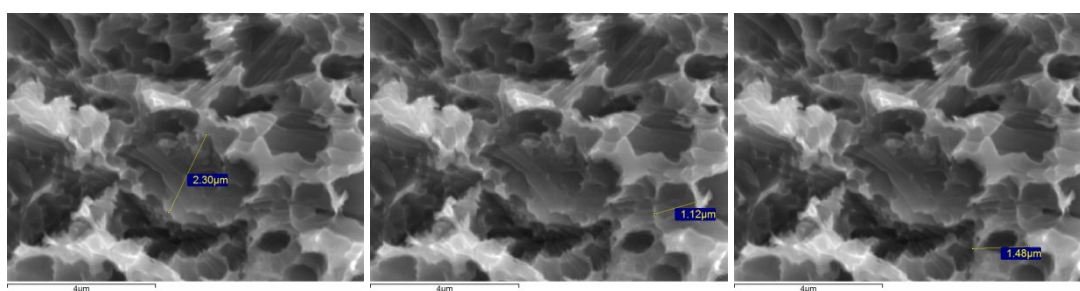


Fig. 8 Imágenes SEM de los microporos creados en la superficie 1. Aumentos 10.000X.

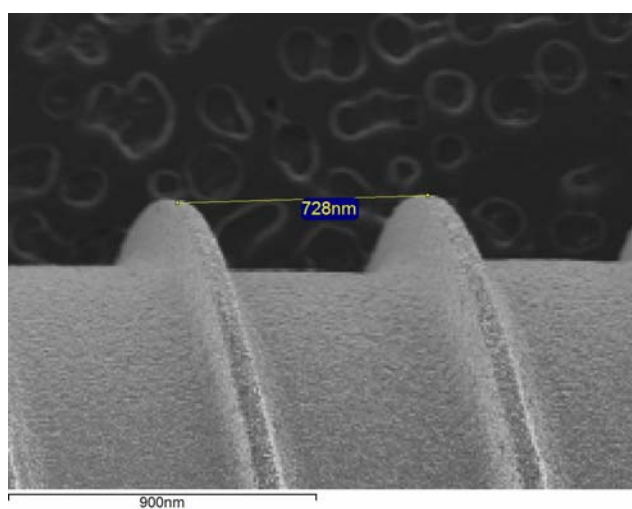


Fig. 9 Distancia entre espiras de la superficie 1. Imagen SEM 10X.



La superficie 2 mostró Titanio en forma de ión metálico (Ti). **(Fig.10)** En la zona del cuello del implante, el análisis de alta resolución también mostró la presencia de Titanio (Ti), Carbono (CaCO_3) y Oxígeno (SiO_2). **(Fig.11)** El análisis de sonda EDX mostró una distancia entre las espiras de 965nm. **(Fig. 12)** Los microporos presentes se observan en la figura 13, con diámetros de 1.42, 1.53 y 2.51 μm . **(Fig. 13)**

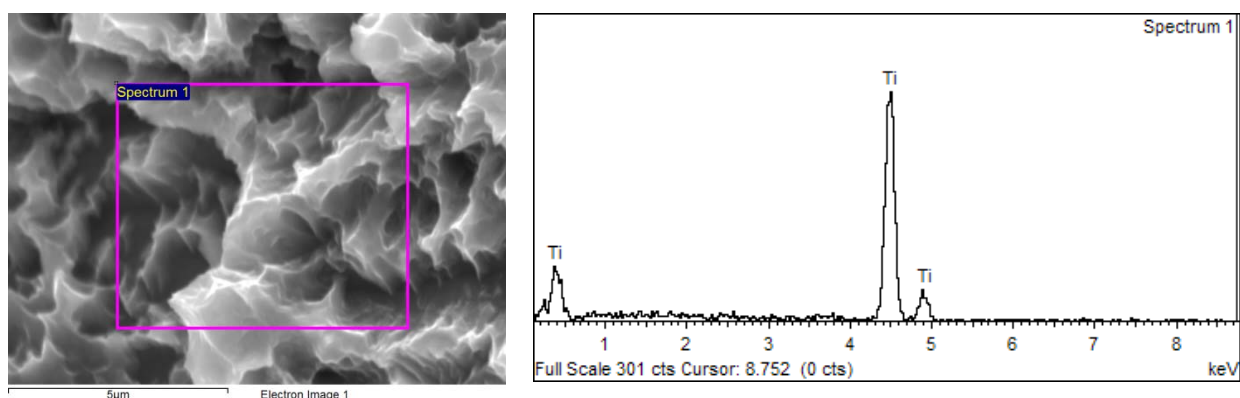


Fig. 10 Composición química superficie 2.

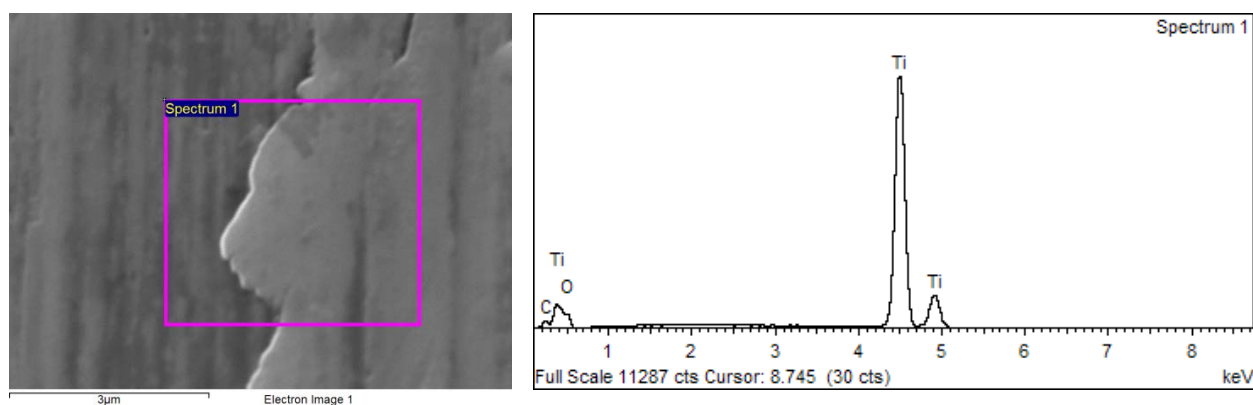


Fig. 11 Composición química superficie 2. La imagen SEM corresponde a la zona del cuello.

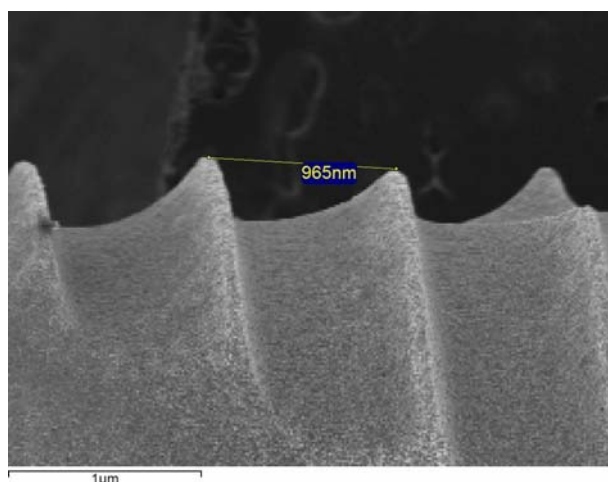


Fig. 12 Distancia entre espiras de la superficie 2. Imagen SEM 12X.

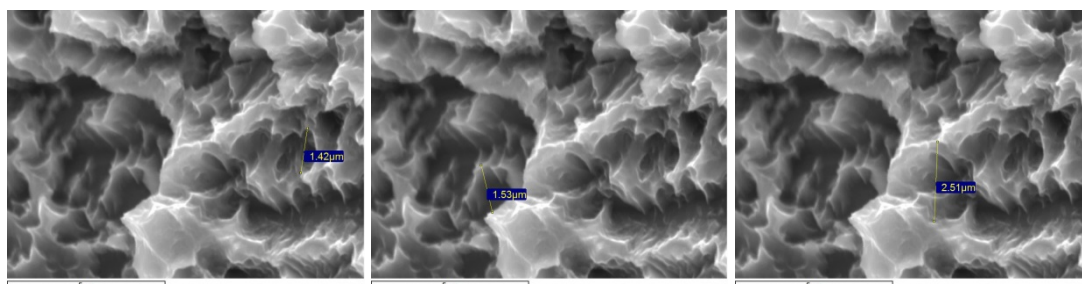


Fig. 13 Imágenes SEM de los microporos creados en la superficie 2. Aumentos 10.000X.

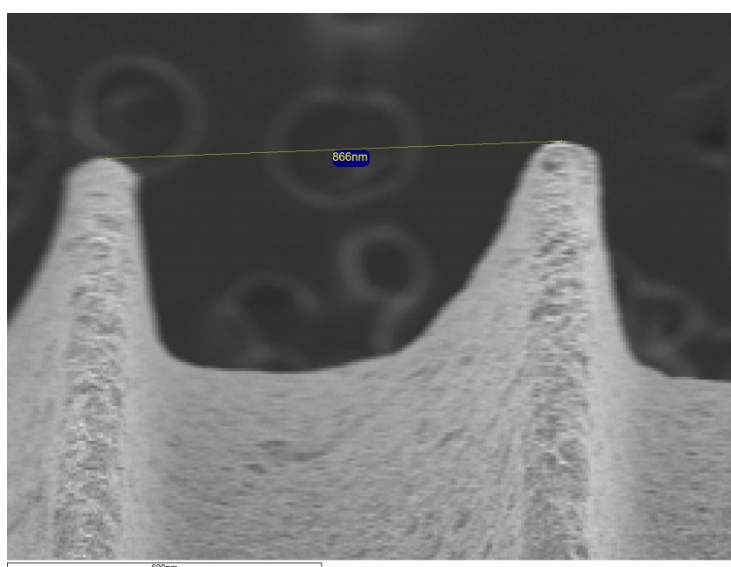


Fig. 14 Distancia entre espiras de la superficie 3. Imagen SEM 12X.

En la superficie 3 la distancia entre las espiras fue de 866nm (**Fig. 14**). El análisis mostró la presencia de Titanio, Carbono y Oxígeno. El Titanio se presentó en forma de Óxido de Titanio (TiO_2) y el Carbono en forma de Dióxido de Carbono (CO_2) (**Fig.15**). La sonda EDX reveló

microporos de 998nm, 1.33µm y 1.85µm (**Figs. 16**).

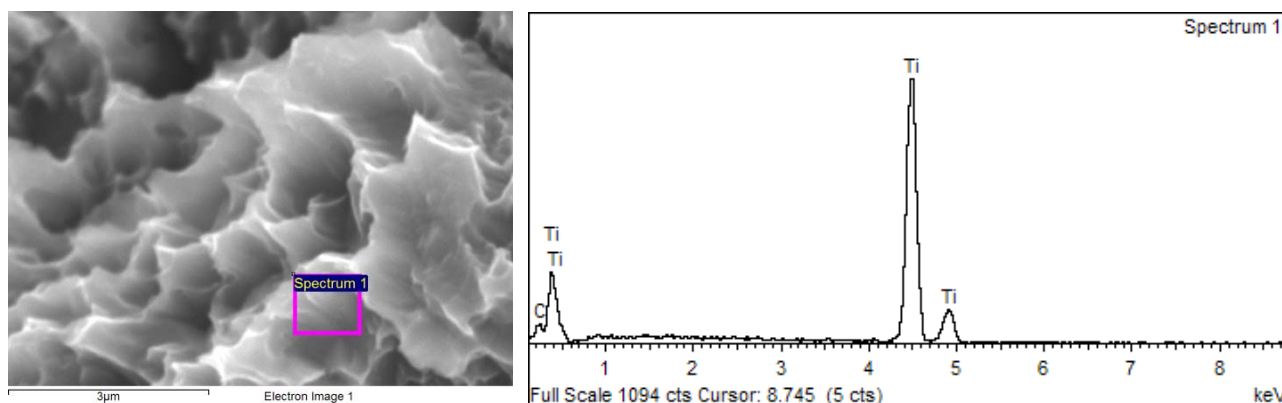


Fig. 15 Composición química superficie 3.

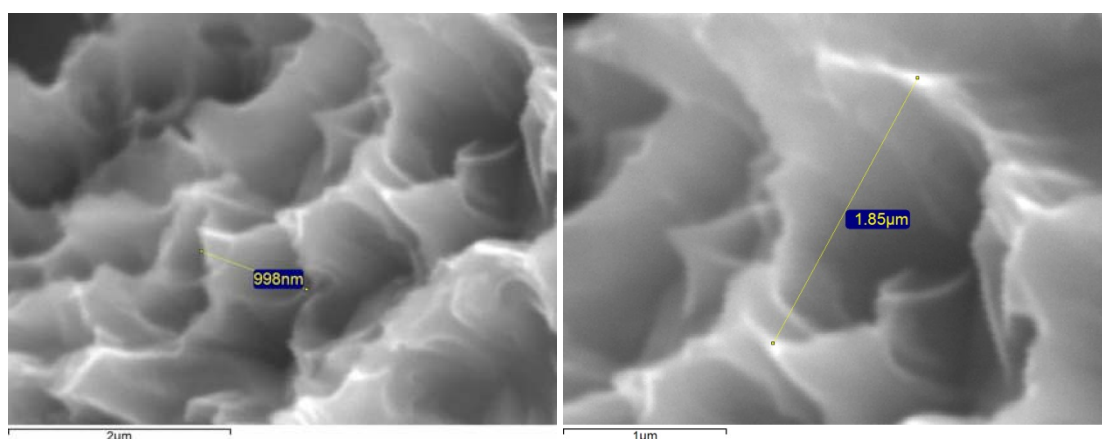


Fig. 16 Imágenes SEM de los microporos creados en la superficie 3. Aumentos 10.000X.

En todas las superficies, el escaneo de alta resolución demostró que el titanio estaba presente en grupos de óxido y en forma de titanio metálico. También se observaron pequeñas cantidades de Oxígeno y Carbono en diferentes formas químicas que pueden atribuirse al proceso de limpieza, revestimiento, mecanizado y pulido, lo que indica que este proceso no altera la composición de las superficies (**Tabla 1**).

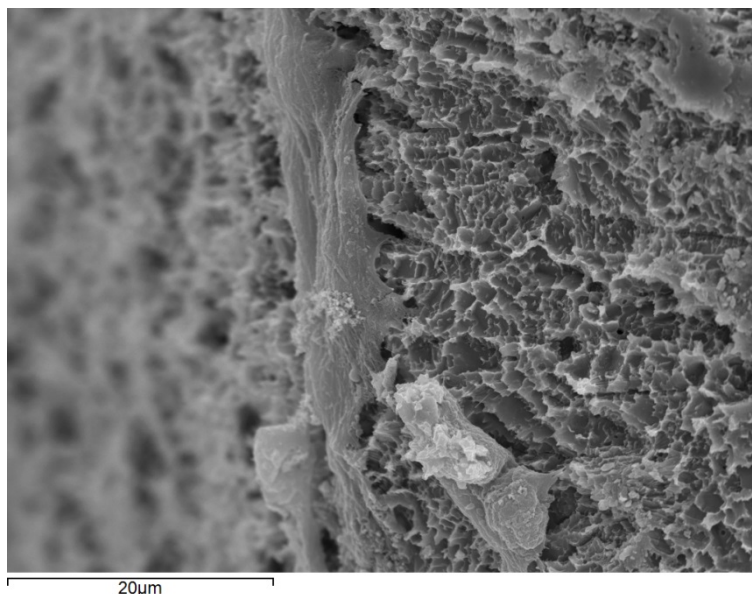


Fig. 17 Imagen de microscopio electrónico de barrido de las células madre mesenquimales de pulpa dental cultivadas en contacto con la superficie 1. Ampliación original: 2.000X.

Las células madre mesenquimales de pulpa dental se cultivaron y se expandieron en todas las superficies con éxito. Desde el cultivo en las superficies establecidas con células, hubo un número suficiente de células presentes después de 7 días, dispuestas tanto

en zonas de valle como en zonas de espira de los implantes y con diversa morfología. Se observa también la formación de elementos celulares de adhesión celular. Las células se disponen en las tres superficies tanto individualmente como en nichos celulares, sin alterarse su morfología. Esto sugiere una mejora en la adhesión celular en las superficies tratadas. (**Figs. 17, 18, 19 y 20**)

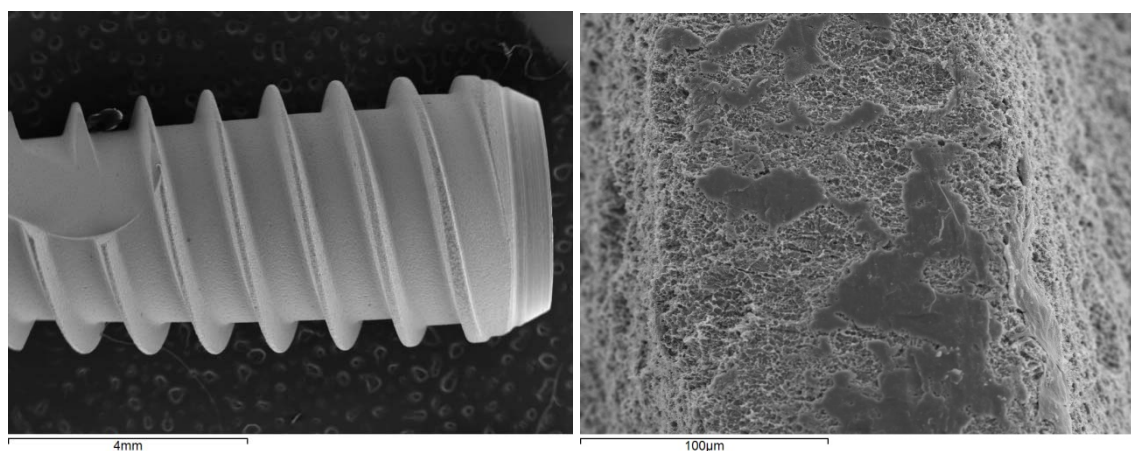


Fig. 18 Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las células madre mesenquimales de pulpa dental cultivadas en contacto con la superficie 1. Ampliación original de izquierda a derecha 12X y 500X.

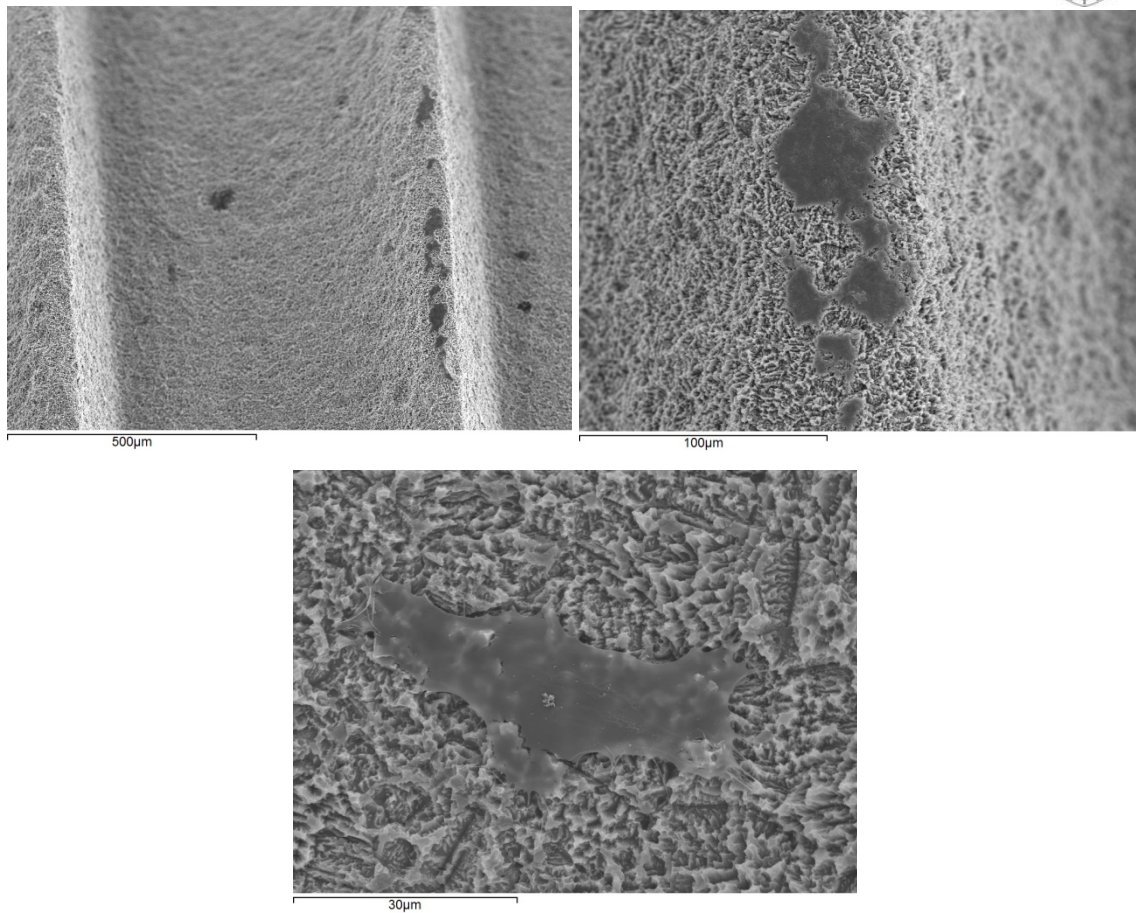


Fig. 19 Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las células madre mesenquimales de pulpa dental cultivadas en contacto con la superficie 2. Ampliación original de izquierda a derecha y de arriba a abajo 100X, 500X y 1.500X.

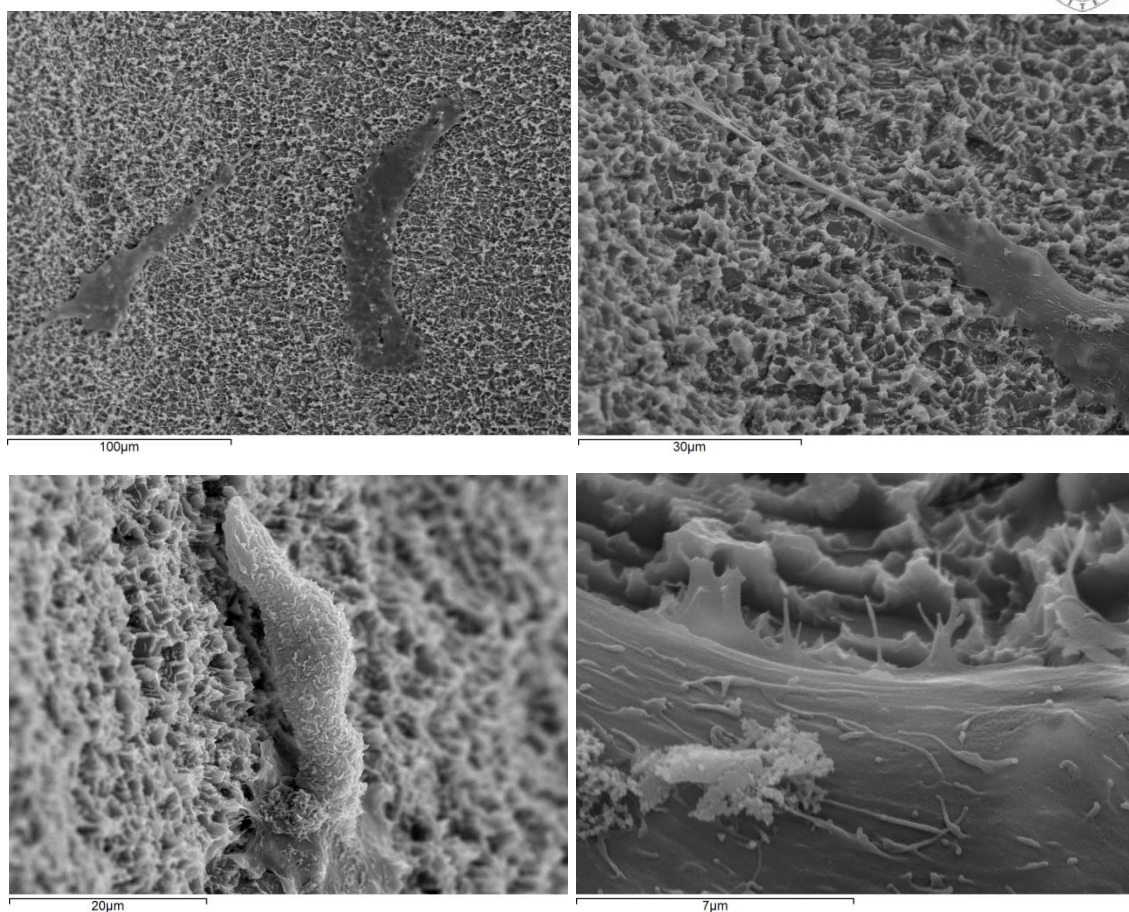


Fig. 20 Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las células madre mesenquimales de pulpa dental cultivadas en contacto con la superficie 3. Ampliación original de izquierda a derecha y de arriba a abajo 500X, 1.000X, 2.000X y 10.000X.

Las medidas de rugosidad ópticas y el escaneo imágenes de microscopía electrónica de las diferentes superficies demuestra que las muestras de superficies SLA tienen macro y micro rugosidad microscópica, debido al impacto de las partículas de óxido de aluminio durante el proceso de arenado y los poros creados por el grabado ácido con diferentes tamaños y diámetros distribuidos uniformemente a lo largo de las superficies. No se observaron diferencias significativas en la rugosidad 3D entre ambas muestras ni en la composición química.



Tabla 1. Resultados del análisis de dispersión de rayos X (XPS) de las diferentes superficies de los implantes.

Sup. 1								
Elemento	Conc.	Intensity Corn.	Peso %	Peso Sigma %	% Atom	Compd %	Fórmula	Iones
C K	0.51	0.7412	1.40	0.26	2.97	5.11	CO ₂	0.36
Ti K	25.82	0.9134	56.89	0.37	30.36	94.89	TiO ₂	3.64
O			41.72	0.36	66.67			8.00
Total			100.00				Cationes totales	4.00

Sup. 2 tornillo					
Elemento	Conc.	Intensity Corn.	Peso %	Peso Sigma %	% Atom
Ti K	2.25	1.0000	100.00	0.00	100.00
Total			100.00		

Sup. 2 cuello					
Elemento	Conc.	Intensity Corn.	Peso %	Peso Sigma %	% Atom
C K	4.11	0.7476	4.75	0.34	11.38
O K	6.71	0.2214	26.17	0.87	47.09
Ti K	74.87	0.9356	69.08	0.85	41.53
Total			100.00		

Sup. 3								
Elemento	Conc.	Intensity Corn.	Peso %	Peso Sigma %	% Atom	Compd %	Fórmula	Iones
C K	0.65	0.7791	7.42	1.09	13.46	27.18	CO ₂	1.62
Ti K	4.38	0.8875	43.66	1.06	19.87	72.82	TiO ₂	2.38
O			48.92	1.19	66.67			8.00
Totals			100.00				Cationes totales	4.00



5. DISCUSIÓN

La superficie de un implante dental determina la fase inicial de la respuesta biológica y por lo tanto tiene una gran influencia en su integración con los tejidos circundantes. La proliferación y la diferenciación de osteoblastos sobre la superficie del implante se ve influenciada por la microestructura de las superficies. Así, los diferentes tratamientos de superficie mejoran la osteointegración del implante. En el presente estudio, el tratamiento con SLA aporta características óptimas de la superficie que facilitan la adhesión celular.

Resultados similares se han encontrado en diversos estudios reportados en la literatura. Tal es el caso del estudio realizado por **Annunziata** y colaboradores en el que se estudiaron dos tipos de superficies de titanio puro sometidas a un proceso de oxidación anódica en una solución de ácido sulfúrico y ácido fluorhídrico en comparación con superficies de control. Sobre las superficies se sembraron células madre mesenquimales de médula ósea y se midió la síntesis de marcadores osteogénicos. También se evaluaron los efectos sobre la diferenciación celular mediante la expresión de marcadores específicos osteoblásticos, como la actividad de la fosfatasa alcalina, la producción de osteocalcina y la mineralización de la matriz extracelular. Las imágenes SEM mostraron una microtopografía compleja con ranuras decrecientes en tamaño y profundidad hacia el ápice de la superficie. En la muestra oxidada se observó una superficie uniformemente rugosa con microporos con un valor medio de $47 \pm 11 \mu\text{m}$, distribuidos sobre toda la superficie en patrón de panel. Las imágenes de mayor escala muestran un aspecto granular uniforme con nanopartículas de diámetro medio de $39 \pm 0.9 \text{ nm}$. Las células madre mesenquimales de médula ósea aparecieron repartidas en ambas superficies con interacciones intercelulares. Aunque al inicio la proliferación celular fue mayor en las superficies oxidadas, en 7 días los valores se igualaron entre las superficies de prueba y control, lo que indica que se alcanzó una tasa de proliferación similar.



La actividad de la fosfatasa alcalina es un marcador temprano de la diferenciación osteogénica, siendo esta fosfatasa una enzima implicada en la formación de cristales de hidroxiapatita durante la mineralización de la matriz extracelular. Tras 14 días, se observó mayor actividad de la fosfatasa en las superficies oxidadas en comparación con la muestra control de manera significativa. La diferenciación osteogénica de las células madre también se vio mejorada en las superficies oxidadas debido a la expresión de niveles mayores de osteocalcina. Además, la matriz presentaba niveles de mineralización dos veces más altos que las superficies de control. Las superficies oxidadas por tanto, mejoran la adhesión de BM- MSC, así como su diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico.¹⁸

En el estudio de **Carneiro** y colaboradores se analizaron cincuenta y seis discos de Titanio grado II. Veintiocho discos se mantuvieron con la superficie mecanizada original de los discos, mientras el resto de las muestras fueron tratadas con grabado ácido. Los discos mecanizados presentaron ranuras paralelas. Sin embargo, las superficies con grabado ácido mostraron rugosidad con microporos presentes a 500, 3000 y 10.000 aumentos. En este estudio se analizó también con sonda EDS la composición química, que fue equivalente en ambas superficies. Las células mesenquimales de médula ósea humana presentaron adhesión y difusión. Sin embargo, las superficies mecanizadas mostraron una morfología orientada de acuerdo con las ranuras de la superficie. Las células de las superficies grabadas presentan una morfología poligonal y menos dispersión con muchos puntos de adhesión focal.¹

Tabbsun y colaboradores analizaron ciento sesenta implantes divididos en dos grupos, uno con mecanizado y otro con arenado y grabado ácido. Ambas superficies diferían la rugosidad de la superficie. Las superficies mecanizadas mostraron un valor promedio de rugosidad superficial de 0,45 mm que fue significativamente menor que la de la superficie grabada (1,47 mm). La diferencia en los picos de los valles entre los dos grupos no fue significativa.⁸

Balloni y colaboradores estudiaron el efecto de las superficies tratadas con doble grabado ácido. Las células madre mesenquimales de médula ósea adquirieron



una forma de huso y cuboide en comparación con la forma aplanada de las superficies de control sin tratar. La superficie tratada mostró mayor expresión de marcadores osteogénicos, como BMP-2 y Runx2 relacionados con un aumento en colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina, necesarios para la osteointegración.⁴²

Gittens y colaboradores examinaron discos de Ti SLA. Se observaron protuberancias con tamaños de 500 a 1000 nm de diámetro y alrededor de 80 a 500 nm de altura. La diferenciación de osteoblastos se mejoró. Sin embargo, la actividad de ALP se redujo y la producción de osteocalcina se aumentó. La combinación de las rugosidades a nivel nano y microescala produce un efecto sinérgico en la diferenciación celular. Estos resultados sugieren una posible mejora en la osteointegración.²¹

La implantación de iones puede ser una alternativa a los métodos convencionales de grabado y arenado. Así lo demuestra el estudio realizado en el año por **Kim** y colaboradores en el que utilizaron discos de Titanio puro de grado IV tratados con SLA. Se analizaron una superficie con SLA de control y otra con implantación de un ión de Magnesio por microscopía electrónica de barrido (SEM) La superficie SLA mostró una morfología rugosa e irregular con numerosos poros con bordes afilados. Estas características morfológicas no se vieron alteradas con la implantación de los iones. La presencia de oxígeno en forma de óxido de magnesio en estas superficies se atribuye a la formación de este compuesto durante la implantación de los iones. La rugosidad media de las superficies SLA era de $2,0 \pm 0,5$ nm y su valor no cambió después de la implantación de los iones. En el día 1, la proliferación de las células cultivadas en SLA Ti fue menor que el de las células cultivadas en Mg-Ti SLA y esta diferencia se observó de forma continua hasta 15 días. El número de células adherentes en Mg-SLA Ti fue 2,15 veces mayor que la de SLA Ti. Las imágenes de fluorescencia mostraron que casi todas las células eran viables y mantenían una morfología similar a la de los fibroblastos durante el cultivo, por lo que la implantación de mg no tuvo efecto citotóxico. Casi todas las células mantuvieron una morfología esférica sobre la superficie de SLA Ti. Sin embargo, numerosas células presentaron un puente de membrana extracelular y



morfología aplanada en la superficie Mg-Ti SLA. Por lo tanto, estos resultados indicaron que los iones Mg implantados facilitan la adhesión celular inicial rápida de MSC y proporcionan un efecto beneficioso durante la etapa inicial de integración ósea.

25

Mamalis y colaboradores estudiaron una superficie estándar SLA y una superficie SLA activa con N y NaCl, a las cuales sembraron células madre mesenquimales de ligamento periodontal humano (HPDL). No hubo diferencias en la fijación inicial celular entre las dos superficies, lo que indica que ni el aumento de la energía de superficie ni la capacidad de humectabilidad o hidrofilia de la superficie SLA cativa afecta a la respuesta inicial de las células HPDL en las superficies rugosas. Después de 24 h de incubación, la proliferación de células HPDL se incrementó en la superficie SLA activa de manera significativa. En cambio, tras 72h, los valores se igualaron en ambas superficies.⁶

No sólo la microtopografía superficial mejora la adhesión de células madre mesenquimales, también las células procedentes de osteosarcoma humano, como las SAOS-2 se adhieren y cambian su morfología en superficies tratadas. Así lo refleja el estudio de **Conserva** y colaboradores que analizaron varias superficies de diferentes casas comerciales. A bajo aumento, todas las superficies presentaron una superficie homogénea. A mayor aumento (50.000x), las diferencias en la microestructura se hicieron evidentes, dependiendo de los diferentes tratamientos de superficie: La superficie *MK III* mostró una topografía lisa con surcos longitudinales paralelos y crestas debido a la fabricación industrial. Los implantes *Ankylos* y *Silhouette* tratados con chorreado de arena se caracterizaron por la presencia de cráteres. Las dos superficies mostraron diferentes morfologías de rugosidad y dimensión de los cráteres, según el diámetro, la dureza y la fuerza del impacto de la partícula. Las superficies *Osseotite* y *SLA* presentaron una microestructura compleja caracterizada por microalveolos debido al proceso de grabado ácido. Las superficies anodizadas *TiUnite* presentaron poros con dimensiones de unas pocas micras. Mediante el uso de SEM, e analizó la morfología celular de células SAOS- 2 procedentes de osteosarcoma humano



que se sembraron en todas las superficies. A las 6 h de crecimiento en contacto con la superficie *Mk III*, las células mostraron una forma globular con pseudópodos sobre la superficie del implante. A las 24 h se formaron numerosos pseudópodos largos y finos que irradian desde el cuerpo celular y en 72 h adquirieron una forma aplanada. Contrariamente a los otros implantes, la superficie no estaba completamente cubierta de células. En contacto con la superficie *Ankylos* el número de células fue aumentado considerablemente en 24h y se observó la unión de varios pseudópodos en uno, mostrando una apariencia larga y estirada. En la superficie SLA de *Straumann*, el número de células no aumentó hasta las 72 h y presentó forma globular.¹⁴

Resultados análogos muestra el estudio de **Ramaglia** y colaboradores en el que las células SAOS-2 se adhirieron y diferenciaron hacia un fenotipo osteoblástico tras ser cultivadas en superficies de Titano tratadas con grabado ácido en comparación con las superficies de control mecanizadas. Se encontraron nichos y agrupaciones celulares y la morfología se volvió irregular con numerosas extensiones celulares. Aunque la producción de fosfatasa alcalina e Interleuquina-6 no fue significativa entre ambas superficies, si lo fue la producción de Coágено I y el receptor de osteoblastos $\alpha 2-\beta 1$, lo que sugiere una posible diferenciación hacia fenotipo osteoblástico de estas células en contacto con las superficies tratadas.⁴⁹

La literatura es discordante y es difícil comparar los resultados de diferentes estudios debido a la gran cantidad de las variables involucradas: tipo de células, densidad de placas, el tipo de tratamiento de la superficie, contaminación de la superficie, parámetros evaluados, los tiempos para la observación de datos, etc.

Otro método en auge es el tratamiento con recubrimientos ya sean orgánicos o inorgánicos, aunque los diversos procedimientos a los que son sometidas las superficies pueden producir diversos elementos químicos. **Mendoca** y colaboradores analizaron discos comerciales de titanio grado IV. Las superficies se trataron con recubrimiento por inmersión en circonio o aluminio en forma de sol-gel. El análisis XPS mostró trazas de diferentes componentes químicos en cada superficie. La pequeña



cantidad de Mg, Zn, N, Ca, P y Si se atribuyó al proceso de limpieza y revestimiento. Las células madre mesenquimales se cultivaron y se expandieron en todas las superficies con éxito. Las células formaron múltiples capas y se diferencian hacia fenotipo osteoblástico.²⁷

Santander y colaboradores analizaron varias superficies de Titanio de grado V tratadas con un proceso de arenado con óxido de aluminio y posteriormente fueron anodizadas con calcio y fósforo en comparación con superficies control. Se midieron con microscopia electrónica y se cultivaron células madre de medula ósea en todas las superficies. Las imágenes de microscopía electrónica demostraron que las muestras de superficies tratadas presentaron rugosidad macro y microscópica, debido al impacto de las partículas de óxido de aluminio y poros con un diámetro de 1-2 micras distribuido uniformemente a lo largo de la superficie. Las muestras no tratadas y tratadas mostraron un valor medio de área de rugosidad de $0.276 \pm 0,08$ micras y $2,8 \pm 0,36$ micras, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la rugosidad 3D entre ambas muestras. El análisis químico mostró la presencia de Oxígeno, Calcio, Fósforo y Sodio, elementos introducidos en la superficie durante el proceso de anodización. Se observó también un aumento significativo en la adhesión celular en las superficies tratadas tras 24 h en comparación con las no tratadas. Se formó una fina capa de células que cubren completamente la superficie tratada de los discos. En ambas superficies se aumentó la expresión de los marcadores de diferenciación osteogénicas. Sin embargo, las muestras de superficies tratadas fueron capaces de mejorar los niveles de expresión de osteopontina y Runx-2 en comparación con la superficie no tratada en ausencia de cualquier inductor de la diferenciación química. Runx-2 es un marcador temprano osteogénico y sirve como un factor de transcripción de células. Es esencial para la diferenciación de osteoblastos, la expresión proteínas de la matriz ósea y determina la diferenciación hacia osteoblastos a partir de células mesenquimales, así como la regulación de muchos genes óseos relacionados con una mayor mineralización. La OP juega un papel importante en la calcificación de la matriz de los tejidos duros y en la adhesión, la propagación y la migración de células.



La topografía de la superficie varía mucho en función de los diferentes métodos de medición y evaluación técnicas y a los procedimientos de grabado y arenado, según el tipo de partículas utilizados, el tamaño y velocidad de impacto. En el grabado ácido, el tipo de ácido, el tiempo de exposición y la temperatura son factores que influyen en las características de la superficie. El mismo tipo de tratamiento puede dar lugar a su vez a superficies con características muy diferentes y por lo tanto, la necesidad de estudios clínicos que demuestran la eficiencia de cada superficie obtenida, debe ser reforzada. Se necesitan más estudios clínicos para demostrar los factores que estas diferencias pueden realmente representar. Cuando se altera la topografía de la superficie, su características químicas y / o físicas pueden cambiar al mismo tiempo.⁴⁵

Si bien el tratamiento de las superficies de Titanio mejora las propiedades de la superficie, a su vez puede generar algún tipo de residuo químico. **Duddeck** y colaboradores confirman este hecho en su estudio realizado entre 2010 y 2012, en el que examinaron un total de 54 sistemas diferentes de implantes de 44 implantes de diferentes fabricantes mediante microscopía electrónica. Encontraron una serie de irregularidades topográficas entre las que destaca la creación de la capa de anodizado incompleta. En 16 implantes se encontraron impurezas orgánicas de Carbono y en siete implantes se encontraron impurezas inorgánicas debido a los procesos de fabricación. Los residuos de óxido de Aluminio lograron reducirse en comparación con estudios similares anteriores (2008).⁵⁰

Otro de los tratamientos utilizado en los últimos años consiste en añadir un elemento básico que mejore la humectabilidad y la hidrofilia. **Xing** y colaboradores demostraron que el número de células adheridas en las muestras tratadas con NaOH fue más alto que en las muestras de control. El grupo experimental se hizo más hidrófilo y exhibió una humectabilidad superior. Los ángulos de contacto de las muestras tratadas con NaOH disminuyó gradualmente desde 40° a 6° con el aumento en la concentración de NaOH. Las imágenes de SEM también mostraron que las estructuras porosas en forma de red se distribuyeron de forma similar en cada grupo



experimental y que el tamaño de los mismos disminuyó con el aumento de concentración de NaOH.⁴⁶

Kubies y colaboradores sugirieron que también las células osteoblásticas MG63 aumentan la producción de fosfatasa alcalina y osteocalcina cuando son sembradas en superficies de Titanio. Las células osteoblásticas expresaron más colágeno. El grupo de materiales con la tasa mayor de proliferación fueron la superficie hidrófila TCPS y las superficies grabadas así como la superficie con plasma-spray de Titanio. La fosfatasa alcalina ósea (BAP) es un marcador bioquímico del fenotipo de los osteoblastos en la etapa de diferenciación temprana y de la formación y actividad de los osteoblastos. Esta proteína también está implicada en el proceso de mineralización de los huesos. El factor de crecimiento TGF- β tiene efectos reguladores sobre la migración, proliferación y diferenciación de las células y estimula la matriz extracelular. En la interfase entre el implante y el tejido óseo puede mejorar el crecimiento del hueso en los revestimientos porosos. Las metaloproteinasas de la matriz (MMP), catalizan la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y por tanto desempeñar un papel importante en la remodelación de tejidos. Todos estos marcadores osteogénicos fueron mayores en las superficies tratadas que en las de control.⁵¹

Sin embargo, otro estudio difiere de los resultados anteriores. **Mamalis** y colaboradores encontraron que el número de células MSC y su proliferación se redujo tanto en las superficies SLA como SLA-activa de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en comparación superficies lisas de control. Esta disminución de la proliferación celular condujo a un aumento en la expresión de genes osteogénicos, cuantificados mediante un análisis de microarrays de ADN. Por lo tanto, parece que cuando las células osteoblásticas entran en contacto con superficies rugosas o modificados químicamente, las células osteoblásticas se diferencian hacia un fenotipo oseoblástico o cabría pensar que son incapaces de sobrevivir y someterse espontáneamente a la muerte celular programada (apoptosis). La expresión de una serie de genes que controlan los procesos celulares tales como la diferenciación



celular la transducción de señales, la regulación del ciclo celular, la angiogénesis, la regulación de la transcripción, la adhesión celular y la formación de hueso, se encontró en las células cultivadas en las superficies SLA y SLA-activa en comparación con las superficies de control. Los genes encontrados fueron BMP 6 (proteína morfogenética ósea 6), BMPR 1A (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IA) y TGFBR 2 (receptor TGF beta I), sugiriendo así que la modificación química de las superficies puede ayudar a mejorar la osteointegración temprana.¹¹

Los resultados del estudio de **Colombo** y colaboradores también reflejan, en contraposición de la mayoría de la literatura publicada, una reducción de la expresión y diferenciación de células madre de médula ósea en superficies de la aleación de Titanio-Vanadio-Aluminio (Ti-6Al-4V) tratadas con fosfato tricálcico. La síntesis de marcadores osteogénicos y matriz extracelular se vio su vez reducida. Esto sugiere que a introducción de elementos en las aleaciones de Titanio no contribuyen a la mejora de la osteointegración.⁵²



6. CONCLUSIONES

1. Los implantes estudiados presentan un diseño en forma de tornillo con unas espiras de entre 728 y 965nm. Los microporos presentes tienen un diámetro entre 998nm y 2.51 μ m.
2. La composición de todos ellos fue de Titanio, Carbono y Oxígeno presentes en diferentes formas químicas.
3. Las células madre mesenquimales de pulpa dental se adhieren en su superficie después de 7 días de forma similar y adecuada para obtener un previsible proceso de osteointegración en su aplicación clínica.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Carneiro-Campos LE, Fernandes CP, Balduíno A., Leite ME, Leita M. The effect of titanium topography features on mesenchymal human stromal cells' adhesion. Clin. Oral Impl. Res. 2010;21:250-54.
2. Yan Guo C., Matinlinna JP y Tang AT. Effects of Surface Charges on Dental Implants: Past, Present, and Future. Int J Biomat 2012.
3. de Jonge L., Leeuwenburgh S., Wolke J., and John A. Jansen. Organic-Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. Pharm Res, 2008;25(10):2357-69.
4. Daood U., Bandey N., Bin-Qasim S., Omar H. y Saad K. Surface characterization analysis of failed dental implants using scanning electron microscopy. Acta Odon Scan 2011;69:367-73.
5. Abuhussein H., Pagni G., Rebaudi A. y WangH-L. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. Clin. Oral Impl. Res. 2010;21:129-36.
6. Mamalis A., Markopoulou C., Vrotsos I. y Koutsilirieris M. Chemical modification of an implant surface increases osteogenesis and simultaneously reduces osteoclastogenesis: an in vitro study. Clin. Oral Impl. Res. 2011;22:619-26.
7. Palmquist A., Omar M., Esposito M., Lausmaa J. y Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. J R Soc Interface 2010;7:515-27.
8. Tabassum A., Meijer G., Wolke J. y Jansen J. Influence of surgical technique and surface roughness on the primary stability of an implant in artificial bone with different cortical thickness: a laboratory study. Clin. Oral Impl. Res. 2010;21:213-20.
9. Bartold P-M., Kuliwaba J-S., Lee V., Shah S., Marino V. y Fazzalari N. L. Influence of surface roughness and shape on microdamage of the osseous surface adjacent to titanium dental implants. Clin. Oral Impl. Res. 2011;22:613-18.
10. Rodrigues C., Cândido A., Shimano A. y da Costa M. In vitro analysis of the influence of surface treatment of dental implants on primary stability. Braz Oral Res. 2012;26(4):313-7.
11. Mamalis A. y Silvestros S. Analysis of osteoblastic gene expression in the early human mesenchymal cell response to a chemically modified implant surface: an in vitro study. Clin. Oral Impl. Res. 2011;22:530-37.



12. Stanford C. Surface Modification of Biomedical and Dental Implants and the Processes of Inflammation, Wound Healing and Bone Formation. *Int J Mol Sci.* 2010;11:354-69.
13. Gaviria L., Salcido JP., Guda T. y Ong J. Current trends in dental implants. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2014;40:50-60.
14. Conserva E., Menini M., Ravera G. y Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast-like cells. An in vitro comparative study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2013;24:880-89.
15. Meyer U., Büchter A., Wiesmann HP, Joos U., y Jones DB. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cells Mat* 2005;9:39-49.
16. Novaes A., de Souza S., de Barros R., Pereira K., Lezzi G., y Piattelli A. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. *Braz Dent J* 2010;21(6):471-81.
17. Hayes J., Khan I., Archer C. y Richards R. The role of surface microtopography in the modulation of osteoblast differentiation. *Eur Cells and Mat* 2010;20:98-108.
J Exp Zool (Mol Dev Evol) 2008;310. Disponible en www.interscience.wiley.com.
18. Annunziata M., Oliva A., Buosciolo A., Giordano M., Guida A. y Guida L. Bone marrow mesenchymal stem cell response to nano-structured oxidized and turned titanium surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012;23:733-740.
19. Thakral GK, Thakra R., Sharma N., Seth J. y Vashisht P. Nansurface-The Future of Implants. *J Clin and D Res.* 2014;8(5):7-10.
20. Depprich R. y cols. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head & Face Medicine* 2008;4:29-37.
21. Gittens R. y cols. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* 2011;32(13): 3395-403.
22. Ku CH, Pioletti D., Browne M. y Gregson P. Effect of different Ti-6Al-4V surface treatments on osteoblasts behaviour. *Biomater* 2002;23:1447-54.
23. Rosa M., Albrektsson T., Francischone CE, Schwartz y Wennerberg A. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *J Appl Oral Sci.* 2012;550-55.



24. Da Silva JS, Campos S., Neves AO, Galvao CA, Alves C. y Tesconi A. Osteoblastlike Cell Adhesion on Titanium Surface Modifies by Plasma Nitriding. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:237-44.
25. Kim BS, Kim JS, Park JM, Choi BY, Lee J. Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell. *Materials Sci and Eng C* 2013;33:1554–1560.
26. Schmidlin P., Muller P., Attin T., Wieland M., Hofer D. y Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci* 2013;21(1):48-55.
27. Mendoca G. y cols. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblastspecific gene expression. *Biomater* 2009;30:4053-62.
28. Kang B-S. On the Bone Tissue Response to Surface Chemistry Modifications of Titanium Implants. Department of Biomaterials Institute of Clinical Sciences Sahlgrenska. Academy University of Gothenburg. 2011. Disponible en <http://hdl.handle.net/2077/26273>.
29. Kang BS, Sul YT, Johansson C., Oh SJ, Lee HJ y Albrektsson T. The effect of calcium ion concentration on the bone response to oxidized titanium implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012;23:690–97.
30. Lavenus S., Louarn G. y Layrolle P. Nanotechnology and Dental Implants. *Int J Biomater* 2010.
31. Manresa C., Bosch M., Manzanares MC, Carvalho P., y Echevarría JJ. A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images. *Clin. Oral Impl. Res.* 2014;25:702-6.
32. Ehrenfest D., Coelho P., Kang B-S., Sul Y-T. y Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in Biotechnology* 28(4). Disponible en [10.1016/j.tibtech.2009.12.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.003)
33. Loberg J., Mattisson I. y Ahlberg E. Integrated biomechanical and topographical surface characterization (IBTSC). *Applied Surface Science* 2014;290:215-22.
34. Lymperi S., Ligoudistianou C., Taraslia V., Kontakiotis E. y Anastasiadou E. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *The Open Dent Jour* 2013;7: 76-81.
35. Egusa H., Sonoyama W., Nishimura M., Atsuta I. y Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *Jour of Prost Res* 2012;56:151-65.



36. Volponi AA., Pang I. y Shape PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. Trends in Cell Bio 2010;20(12):715-22.
37. D'Aquino R. y cols. Human Mandible Bone Defect Repair By The Grafting Of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells And Collagen Sponge Biocomplexes. Eur Cells and Mat 2009;18:75-83.
38. La Noce M. y cols. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. J Dent 2014;42:761-68.
39. D'Aquino R. y cols. Human Dental Pulp Stem Cells: From Biology to Clinical Applications. J Exp Zool 2008.
40. Viña JA, El-Alami M., Gambini J., Borrás C., Viña J. y Peñarrocha MA. Application of mesenchymal stem cells in bone regenerative procedures in oral implantology. A literature review. J Clin Exp Dent. 2014;6(1):60-5.
41. Egusa H., Sonoyama W., Nishimura M., Atsuta I. y Akiyama K. Stem cells in dentistry-Part II: Clinical applications. Jour of Prost Res 2012;56:229-48.
42. Balloni S., Calvi EM, Damiani F., Bistoni G., Calvitti M., Locci P. y cols. Effects of Titanium Surface Roughness on Mesenchymal Stem Cell Commitment and Differentiation Signaling. Int J Oral Maxillofac Implants 2009;24:627-35.
43. Lavenus S., Berreur M., Tricjet V., Pilet P., Louarn G. y Layrolle P. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. Eur Cells and Mat 2011;22:84-96.
44. Chen WC, Kob ChL, Kuoc HN, Lind DJ, Wue HY, Yange L. y cols. Mineralization of Progenitor Cells with Different Implant Topographies. Por Eng 2012;36:173-8.
45. Santander S. y cols. Retraction: In vitro osteoinduction of human mesenchymal stem cells in biomimetic surface modified titanium alloy implants. Dent Mat J 2014;31(5):843-50.
46. Xing H., Komasa S., Taguchi Y., Sekino T. y Okazaki J. Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures. Int J Nanomed. 2014;9:1741-55.
47. Ko YJ, Zaharias RS, Seabold DA, Lafoon JE y Schneider GB. Analysis of the Attachment and Differentiation of Three-Dimensional Rotatory Wall Vessel Cultured Human Preosteoblasts on Dental Implant Surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants 2010;25:722-28.



48. Osathanon T., Bepinyowong K., Arksornnukit M., Takahashi H. y Pavasant P. Human osteoblastic-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *J Oral Sci.* 2011;53(1):23-30.
49. Ramaglia L., Postiglione L., di Spingna G., Capece G., Salzano S. y Rossi G. Sandblasted-acid-etched titanium surface influences in vitro the biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Dental Materials Journal* 2011;30(2):183-92.
50. Duddeck D., Iranpour S., Derman M., Neugebauer J. y Zöller J. Surface characteristics and quality of implants in sterile packaging. *European Journal for Dental Implantologists* 2013;1(9):48-58.
51. Kubies D. y cols. The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of ImplantMaterials. *Physiol. Res.* 2011;60:95-111.
52. Colombo JS, Carley A., Fleming G., Crean J., Sloan A. y Waddington RJ. Osteogenic Potential of Bone Marow Stromal Cells on Smooth, Roughened and Tricalcium Phospathe-Modified Titanium Alloy Surfaces. *Int J Oral Maxilloac Implants* 2012;27:1029-42.

